

Aus dem Institut für Neuropathologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Neuroprotektiver Effekt durch kontinuierliche Noradrenalin
Infusion und Induktion von Glutamattransportern nach ex-
perimentellem Schädel-Hirn-Trauma in der Ratte**

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Stefan Schreiber

aus Hagenow

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. A. von Deimling
2. Prof. Dr. med. P. Vajkoczy
3. Priv.-Doz. Dr. med. V. Hans

Datum der Promotion: 21. November 2008

Abstract-englisch

Objective:

The role of Norepinephrine infusion following traumatic brain injury is still a matter of debate as it might have both beneficial and detrimental effects. Traumatic brain injury results in an excessive increase of extracellular glutamate concentration which is associated with expansion of necrosis. The clearance of extracellular glutamate is mediated by excitatory amino acid transporter proteins (EAAT).

There is evidence for a α_1 receptor mediated induction of glutamate transporter proteins in cell cultures as well as for better neurological outcome in brain injured patients receiving α_1 receptor agonists.

Therefore, the goal of the present study was to elucidate whether continuous low dose NE infusion attenuates posttraumatic glutamate excitotoxicity by the induction of glutamate transporter protein expression in vivo.

Materials and Methods:

148 adult male Sprague–Dawley rats, were anaesthetized with isoflurane before moderate CCII was produced to the right parietotemporal cortex or sham operation was performed. Starting at 4 hours following CCII rats were continuously infused with NE in three different Concentrations (1 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$, 0.3 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$, 0.15 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$) or NaCl via ALZET® osmotic pumps. In these animals contusion volume, MABP and intraparenchymal hemorrhage were determined 48 hours after trauma (n=28). In a second set of experiments only low dose NE (0.15 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$) and NaCl was infused and animals were sacrificed after 48 hours, 7 days or 4 weeks and evaluated either for cortical contusion volume or glutamate transporter protein expression. MABP, blood glucose and blood gases were determined repetitively. The influence of NE infusion on blood pressure was double checked in 12 animals via non invasive systolic blood pressure measurement (SABP).

Extracellular concentrations of glucose, glutamate, lactate, pyruvate and glycerol were determined 4, 24 and 48 hours following CCII via microdialysis in an additional group of animals after low dose NE infusion (n=60).

Results:

Intraparenchymal hemorrhage was significantly increased by 157% and 142% in rats receiving NE in moderate and high doses (0.3 and 1.0 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$). Contusion volume at 48 hours following CCII was significantly decreased by 40% after low dose NE infusion (0.15 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$), but not 7 days and 4 weeks after CCII. Low dose NE treatment led to significantly reduced extracellular glutamate ($41,1 \pm 16,1 \mu\text{mol}/\text{l}$ vs. $13,81 \pm 5,05 \mu\text{mol}/\text{l}$, $p < 0,05$) and lactate ($3,29 \pm 1,26 \text{ mmol}/\text{l}$ vs. $1,99 \pm 0,64 \text{ mmol}/\text{l}$, $p < 0,05$) concentrations at 24 and 48 hours after trauma.

Expression of glutamate transporter proteins EAAT1 and EAAT2 was significantly increased 48 hours and 7 days following CCII by 5-10%.

Conclusion:

Continuous low dose NE infusion is neuroprotective following CCII. This effect is at least in part mediated by an increase in glutamate transporter protein expression, which results in decreased extracellular glutamate concentrations.

Keywords:

glutamate, traumatic brain injury, neuroprotection, mikrodialysis

Inhalt	5
ABSTRACT-ENGLISCH	3
INHALT	5
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	8
1 EINLEITUNG	10
1.1 Das Schädel-Hirn-Trauma	10
1.2 Der sekundäre Hirnschaden	11
1.3 Glutathomöostase	14
1.3.1 Glutamat	14
1.3.2 Glutamattransporter	14
1.3.3 Glutathomöostase nach experimentellem Hirntrauma	16
1.3.4 Neuroprotektion durch Glutamattransporterinduktion	18
1.4 Noradrenalin	18
1.4.1 Noradrenalin und SHT Management	18
1.4.2 Noradrenalin und Glutamat	19
2 FRAGESTELLUNG	20
3 MATERIAL UND METHODEN	20
3.1 Tierversuche	20
3.1.1 Versuchstiere	20
3.1.2 Controlled Cortical Impact Injury	20
3.1.3 Anästhesie und chirurgische Präparation der Versuchstiere	22
3.1.4 Intravenöse Noradrenalininusion	24
3.1.5 Tötung, Hirnentnahme, Gewebsaufbereitung	26
3.2 Akutversuche - Vergleich verschiedener NoradrenalinKonzentrationen	26
3.2.1 Kontusionsvolumen und intrazerebrales Blutvolumen	27
3.2.2 Nicht-invasive Blutdruckmessung-SABP	27
3.3 Langzeitversuche – Auswirkungen kontinuierlicher niedrigdosierter Noradrenalininfusion	28
3.3.1 Semiquantitative Bestimmung der Glutamatkonzentration (Western Blot)	29
3.4 Mikrodialyse	30
3.5 Statistische Auswertung	33
4 ERGEBNISSE	33
4.1 Akutversuche – Vergleich verschiedener NoradrenalinKonzentrationen	33
4.1.1 Hb, Glucose, pH, Blutgase	34
4.1.2 Blutdruck	35
4.1.3 Kontusionsvolumen	36
4.1.4 Intraparenchymales Blutungsvolumen	38

4.2	Auswirkung einer kontinuierlichen niedrigdosierten Noradrenalininfusion	6
4.2.1	Physiologische Parameter	41
4.2.2	Traumavolumen	45
4.2.3	Western Blot	46
4.2.4	Mikrodialyse	48
5	DISKUSSION	53
5.1	Arterieller Blutdruck	53
5.2	Kontusionsvolumen	55
5.2.1	Akutversuche, Vergleich verschiedener NoradrenalinKonzentrationen	55
5.2.2	Auswirkungen einer kontinuierlichen niedrigdosierten Noradrenalininfusion	58
5.3	Glutamattransporterinduktion	59
5.4	Neuroprotektion durch Beeinflussung des glutamatergen Transmission	62
5.4.1	Glutamattransporter	62
5.5	Extrazelluläre Aminosäuren	62
5.5.1	Glutamat – Verminderung der Excitotoxizität	62
5.5.2	Laktat und Glucose – der ischämische Hirnstoffwechsel	65
5.6	Schlußfolgerung	66
6	ZUSAMMENFASSUNG	67
7	LITERATURVERZEICHNIS	70
	DANKSAGUNG	81
	LEBENS LAUF	82
	EIDESTÄTTLICHE ERKLÄRUNG	83

Für Kathi, Zoe und Luca

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µmol	Mikromol
A.	Arteria
ALS	Amyotrophe Lateralsklerose
AMPA	α-Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-4-Isoxazol-Propionat
BE	Basenüberschuss
BHS	Blut-Hirn-Schranke
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CCII	Controlled Cortical Impact Injury
cm	Zentimeter
CPP	Cerebraler Perfusionsdruck
d	Tag
DABP	diastolischer Blutdruck
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EAAT	Transporter für exzitatorische Aminosäuren
EEG	Elektroenzephalogramm
Fa.	Firma
FK 506	Tacrolimus
GABA	γ-Aminobuttersäure
GLAST	Glutamat-Aspartat-Transporter
GLT	Glialer Glutamattransporter
GTRAP	Glutamattransporter assoziiertes Protein
h	Stunde
H&E	Hämatoxylin/Eosin
Hb	Hämoglobin
HCO ₃	Hydrogencarbonat
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
ICP	intrazerebraler Druck
ivr	in vitro recovery
kDa	Kilodalton

kg	Kilogramm
MABP	Mittlerer arterieller Blutdruck
min	Minute
mm	Millimeter
mmol	Millimol
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
N ₂ O	Stickstoffdioxid
NA	Noradrenalin
NaCl	Natrimchlorid
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NO	Stickstoffmonoxid
O ₂	Sauerstoff
pCO ₂	Kohlendioxidpartialdruck
PFA	Paraformaldehyd
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
pO ₂	Sauerstoffpartialdruck
rCBF	regionaler cerebraler Blutfluss
SABP	systolischer Blutdruck
SBC	Standardbicarbonat
SHT	Schädel-Hirn-Trauma
ÜZ	Überlebenszeit
V.	Vena
v.T.	vor Trauma
Vol%	Volumenprozent
W	Wochen
ZNS	Zentrales Nervensystem

1 Einleitung

1.1 Das Schädel-Hirn-Trauma

Das Schädel-Hirn-Trauma zählt mit einem jährlichen Auftreten aller Schweregrade von 200.000 in der Bundesrepublik Deutschland zu einer der häufigsten Krankheitsursachen (Unterberg et al., 1999). Epidemiologische Daten aus industrialisierten Ländern zeigen eine Inzidenz zwischen 200-300 (Sollmann, 1997) und 800 (Wiesbaden, 1995) pro 100000 Einwohner. Hierbei ist insbesondere das schwere SHT mit Bewusstlosigkeit über 48 Stunden von enormer sozioökonomischer Bedeutung. So zeigen diese Patienten abhängig vom Lebensalter eine 10 bis 100mal höhere Letalität im Vergleich zu Patienten mit kürzerer Bewusstlosigkeit (Firsching und Frowein, 1990: ; Frowein et al., 1992). Von den Überlebenden leidet ein erheblicher Anteil unter dauerhaften Behinderungen. Nach 1999 veröffentlichten Daten des European Brain Injury Consortium starben 31% von 1005 schwer und mäßiggradig Schädel-Hirn traumatisierten Patienten. Weitere 31% erholten sich ohne klinische Behinderung, wohingegen 16% schwerbehindert, 20% leichtbehindert und 3% in einem vegetativen Status blieben (Murray et al., 1999). Eine andere Übersichtsarbeit unter Einschluss von 5612 Patienten zeigt eine Mortalität des schweren SHT zwischen 23 und 40%. Weitere 43 bis 60 % der Patienten hatten nach 6 Monaten schwere Behinderungen oder waren im vegetativen Status (Hukkelhoven et al., 2003). Von ca. 10.000 -15.000 Patienten mit schwerem behandlungsbedürftigem SHT (Sollmann, 1997) liegt bei etwa einem Drittel eine operationspflichtige Fraktur oder Blutung vor. Die übrigen zwei Drittel werden konservativ auf der Intensivstation behandelt (Unterberg et al., 1999). Durch die Etablierung von standardisierten Behandlungsmethoden wurde in den vergangenen Jahren versucht, die Prognose insbesondere schwer Schädel-Hirn traumatisierter Patienten zu verbessern (Bullock, 1995: ; Fakhry et al., 2004: ; Maas et al., 1997: ; Piek und Jantzen, 2000: ; Teasdale et al., 1997). Hierbei kommt vor allem der konservativen Therapie auf der neurochirurgischen Intensivstation besondere Bedeutung zu. Die kardiopulmonale Stabilisierung der Patienten sowie die Vermeidung von Hyperthermie, Glucosstoffwechselstörungen und Elektrolytentgleisungen tragen durch Reduzierung der posttraumatischen pathophysiologischen Kaskade neben der operativen Therapie wesentlich zur Prognoseverbesserung der Patienten bei. Daher stehen außer diesen basistherapeutischen Maßnahmen

die Erforschung der Dynamik des sekundären Hirnschadens und Möglichkeiten zu dessen Beeinflussung im Zentrum des Interesses experimenteller Neurotraumatologie.

1.2 Der sekundäre Hirnschaden

Die Schädigung beginnt mit einer direkten mechanischen Gewalteinwirkung auf das Gehirn. Als Folge dieser primären Verletzung bildet sich als morphologisches Korrelat eine Kontusion. Das Ausmaß dieser initialen Traumatisierung ist vor allem abhängig von exogenen Faktoren und damit therapeutisch nicht beeinflussbar. Direkt im Anschluss daran setzt jedoch die sekundäre Schädigung des Gehirns ein, die für Therapiemaßnahmen potentiell zugänglich ist und deren Ausmaß wesentlich von endogenen Faktoren wie z. B. Alter und Vorerkrankungen abhängt. Die Hauptmanifestationen dieser sekundären Schädigung wie Hirnödem, erhöhter intrazerebraler Druck und Ischämie sind häufig beschrieben und zumindest zum Teil klinisch fassbar (Baethmann et al., 1989).

Die sekundäre Größenzunahme einer initialen Läsion wurde abhängig von der untersuchten Spezies und experimentellen Methode mit 130 bis 400% angegeben (Eggert et al., 1985; ; Lindsberg et al., 1991; ; Murakami et al., 1999). Eriskat et al. beobachteten einen zweiphasigen Verlauf der Sekundärschädigung bis zu einer Größe von 145% nach kortikaler Kälteläsion in der Ratte. Die Expansion der Nekrose wurde vor allem in den ersten 3 Stunden und zwischen 12 und 24 Stunden nach dem Setzen der Läsion beobachtet. Während 3 und 12 Stunden nach Versuchsbeginn trat keine Größenzunahme auf. Es wurde beobachtet, dass die Größenzunahme auf einem progressiven Untergang von Hirngewebe beruhte und nicht auf einer Expansion der primären Nekrosezone durch Schwellung (Eriskat et al., 1994). Auch Thomale et al. beschrieben nach fokaler Kontusion nach dem Controlled Cortical Impact Modell in der Ratte eine maximale Ausdehnung der Läsion nach 24 Stunden (Thomale et al., 2007).

Zu den verursachenden sekundären pathophysiologischen Kaskaden zählen erhöhter Natrium- und Kalzium-Einstrom, die Bildung freier Radikale, Freisetzung von Zytokinen, entzündliche Veränderungen und Rezeptordysfunktionen, die zur Entstehung eines Hirnödems und sekundären Zelluntergangs in den folgenden Stunden und Tagen beitragen (Graham et al., 2002).

An der Entwicklung des Hirnödems sind zwei pathophysiologische Mechanismen beteiligt. Die Entstehung eines vasogenen Ödems setzt eine gestörte Blut-Hirn-Schranke (BHS) voraus. Durch das Fehlen dieser Barriere treten Plasmaproteine und Wasser ungehindert entlang des kolloidosmotischen Gradienten in das Hirngewebe. Unterstützt werden kann diese pathophysiologische Reaktion durch Mediatorsubstanzen wie Arachidonsäure oder freie Radikale (Hall et al., 1997: ; Hall et al., 1991). Demgegenüber steht das Modell des zytotoxisch vermittelten intrazellulären Hirnödems. Hierbei kommt es durch ein Trauma zur Störung der Zellmembranpermeabilität, in dessen Folge Natrium in die Zellen strömt. Dieses kann bei posttraumatisch unzureichender Gewebepfusion mit folgendem Substrat- und Energiemangel nicht energieabhängig exportiert werden, sodass durch den konsekutiven Wassereinstrom die Zelle schwillt (Baethmann und Kempfski, 1997). Verstärkt wird dieser Prozess durch exzitatorische Aminosäuren, freie Radikale und Gewebeazidose.

In der Genese des primären Zelluntergangs steht ebenfalls die direkte mechanische Schädigung im Vordergrund, die zur sogenannten Mechanoporation, einer ausgeprägten funktionellen Schädigung der Zellmembranintegrität führt. Infolge von Strukturunterbrechungen des Plasmalemmes oder mechanisch veränderten Ionenkanälen kommt es zu einem ungehinderten Konzentrationsausgleich der Ionen des Intra- und Extrazellulär-raumes mit Zusammenbruch des Membranpotentials und Zelltod (Farkas et al., 2006: ; Patt und Brodhun, 1999: ; Wolf et al., 2001).

Ausgehend von der primären Schädigung trägt in den folgenden Stunden und Tagen ein sekundärer Zelluntergang zum Größenwachstum der Nekrose bei. An dessen Entstehung sind Mediatorsubstanzen entscheidend beteiligt. Eine große Rolle spielen hierbei exzitatorische Aminosäuren, freie Radikale und Produkte von NO-Synthetasen, die posttraumatisch in der Nekroserandzone, der so genannten Penumbra, in erhöhten Konzentrationen vorliegen (Hall et al., 1991: ; Smith et al., 1994: ; Stoffel et al., 2002: ; Stoffel et al., 2001). Insbesondere Glutamat scheint durch die Aktivierung von N-Methyl-D-Asparat (NMDA), α -Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-4-Isoxazol-Propionat (AMPA) oder Quisqualat – Rezeptoren den Zelltod auszulösen. Hierdurch können Natrium (als Vermittler des zytotoxischen Ödems) und Kalzium ungehindert in die Zelle einströmen (Jahr und Stevens, 1990: ; Schubert und Piasecki, 2001) bzw. über intrazelluläre „Second messenger“-Systeme freigesetzt werden.

Intrazelluläres Kalzium ist an der Zellschädigung durch die Aktivierung von Proteasen, Lipasen und Nukleasen direkt beteiligt. Dies führt sowohl zur Zerstörung von funktionellen und strukturellen Membranproteinen als auch zur Spaltung der Phospholipidmembran (Banik et al., 1985; ; Faden et al., 1987; ; Seddik et al., 1991). Letzteres führt zur Freisetzung von Arachidonsäure und der konsekutiven Bildung von proinflammatorischen und vasoaktiven Prostaglandinen und Leukotrienen (D'Avella et al., 1990; ; Young, 1992). Nukleasen führen durch direkte DNA Schädigung zum programmierten Zelltod.

Ein weiterer Mechanismus des sekundären Hirnschadens, die Lipidperoxidation, ist durch freie Radikale vermittelt. Hierdurch werden insbesondere in der ersten Stunde nach einem Trauma Blut-Hirn-Schrankenstörungen oder die Schädigung von Zellmembranen verstärkt (Hall, 1997).

Über zahlreiche Wechselwirkungen können sich die einzelnen pathogenetischen Mechanismen gegenseitig verstärken. So ist die Reduktion des kortikalen Perfusionsdruckes sowohl mit einer Zunahme der Ödembildung, als auch mit einer Vergrößerung des Kontusionsvolumens assoziiert (Kiening et al., 2002; ; Kroppenstedt et al., 1999). Posttraumatisch tritt eine Verminderung der zerebralen Perfusion auf, die zu Ischämie und einer Zunahme des Sekundärschadens führt (Bryan et al., 1995; ; Golding et al., 2000; ; Kochanek et al., 1995; ; Kroppenstedt et al., 2000; ; Thomale et al., 2002).

Das neurologische Outcome nach schwerem SHT wird wesentlich vom zerebralen Perfusionsdruck (CPP) als Resultat aus mittlerem arteriellen Blutdruck (MABP) und intrazerebralem Druck (ICP) bestimmt (Chesnut et al., 1993; ; Miller, 1985; ; Rosner et al., 1995), wobei die optimale Höhe des CPP kontrovers diskutiert wird. Nach dem Lund-Konzept, das die vasogene Komponente an der Entstehung von Hirnödem und Hirndruck betont, sollte ein relativ niedriger CPP um 50 mmHg angestrebt werden, um den ICP auf Werte unter 20mmHg zu senken (Asgeirsson et al., 1994; ; Eker et al., 1998). Demgegenüber geht das Modell nach Rosner davon aus, dass der CPP die treibende Kraft für die Aufrechterhaltung eines ausreichenden zerebralen Blutflusses (CBF) ist. In diesem die zytotoxische Komponente der posttraumatischen Schwellung betonenden Modell sollte der CPP zur Verhinderung von Ischämie und Hypoxie in einem Bereich von 70 – 100 mmHg gehalten werden (Rosner et al., 1995).

Die bisher vorgestellten etablierten Therapieprinzipien sind in erster Linie symptomorientiert und führen allenfalls indirekt durch Verminderung von Hypotension und Ischämie zu einer geringeren Zunahme des sekundären Schadens. Trotz intensiver experi-

menteller und klinischer Studien ist es bisher nicht gelungen, die mediatorvermittelten Kaskaden des sekundären Zellschadens ursächlich zu beeinflussen. Die Entwicklung einer solchen präventiven neuroprotektiven Therapie steht jedoch im Mittelpunkt des wissenschaftlichen Interesses. Hierbei kommt der Pathophysiologie des Glutamatstoffwechsels als einem Schlüsselmechanismus der sekundären Hirnschädigung eine zentrale Rolle zu.

1.3 Glutamathomöostase

1.3.1 Glutamat

Als wichtigster exzitatorischer Neurotransmitter des zentralen Nervensystems (ZNS) ist die Aminosäure L-Glutamat an den zentralen physiologischen Abläufen wie Kognition, Gedächtnis und Lernen beteiligt (Danbolt, 2001). Weiterhin ist Glutamat unverzichtbar in der Entwicklung des ZNS (McDonald und Johnston, 1990; Vallano, 1998). Das Ausprossens neuronaler Fortsätze (Rajan und Cline, 1998) wird ebenso beeinflusst wie die GABAerge Aktivität (van den Pol et al., 1998) oder die Migration von Neuronen (Komuro und Rakic, 1993; Rossi und Slater, 1993). Auch an der Signalübertragung in peripheren Organen und im Endokrinium ist Glutamat beteiligt.

Verschiedene Subtypen iono- und metabotroper Glutamatrezeptoren vermitteln die Wirkung des Glutamats (Danbolt, 2001; O'Shea, 2002). Die außerordentliche Stellung wird dadurch unterstrichen, dass Störungen der Glutamathomöostase im Rahmen vieler ZNS-Krankheiten wie der amyotrophen Lateralsklerose, Epilepsie, Morbus Alzheimer, Morbus Parkinson sowie der Schizophrenie, aber auch nach zerebraler Ischämie und Hirntrauma beschrieben wurden (Danbolt, 2001).

Ein Charakteristikum ist der enorme Konzentrationsunterschied entlang der Zellmembran. Mit 10-100 mmol/l ist die intrazelluläre Glutamatkonzentration 10.000-mal höher als die extrazelluläre (1-3 $\mu\text{mol/l}$) (Storm-Mathisen et al., 1992). Zur Aufrechterhaltung des Konzentrationsgefälles muss ein aktives, energieabhängiges Transportsystem synaptisch freigesetztes Glutamat wiederaufnehmen.

1.3.2 Glutamattransporter

Glutamat wird energieabhängig über einen membrangebundenen Natrium-Kalium Transporter von der Zelle aufgenommen (Nicholls und Attwell, 1990). Bisher sind fünf

solcher hochaffiner Glutamattransportsysteme identifiziert worden: GLAST/EAAT1 (Storck et al., 1992), GLT-1/EAAT2 (Pines et al., 1992), EAAC1/EAAT3 (Kanai und Hediger, 1992), EAAT4 (Fairman et al., 1995), und EAAT5 (Arriza et al., 1997). Die in Ratten identifizierten GLAST und GLT-1 Transporter zeigen eine starke Homologie zu den korrespondierenden humanen Proteinen EAAT1 bzw. EAAT2 (Pines et al., 1992; Storck et al., 1992). Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich ausschließlich mit posttraumatischen Veränderungen in Ratten; dennoch soll hier die EAAT-Nomenklatur (excitatory amino acid transporter) weitergeführt werden.

Die Expression der Transportsysteme ist, obwohl es zu Überschneidungen kommt, regional unterschiedlich. EAAT1 wird hauptsächlich im Cerebellum, frontalen Kortex, Hippokampus und in den Basalganglien exprimiert (Lehre et al., 1995), wohingegen EAAT2 vorwiegend im frontalen Kortex, Hippokampus und in den Basalganglien lokalisiert ist. EAAT3 wurde, allerdings in einer viel geringeren Konzentration als EAAT1 und EAAT2, ebenfalls in Hippokampus, Kleinhirn und Basalganglien identifiziert (Conti et al., 1998; Haugeto et al., 1996; Kugler und Schmitt, 1999). EAAT4 wurde bisher in cerebellären Purkinje-Zellen, EAAT5 in retinalen Astrozyten gefunden (Arriza et al., 1997; Fairman et al., 1995).

Den Hauptanteil an der Clearance extrazellulären Glutamats haben die glialen Glutamatransporter EAAT1 und EAAT2 (Amara und Fontana, 2002; Haugeto et al., 1996; Rothstein et al., 1996). Diese sind vorwiegend in der Zellmembran von Astrozyten lokalisiert (Danbolt et al., 1992; Levy et al., 1993; Rothstein et al., 1994), wobei Astrozyten beide Typen koexprimieren können (Lehre et al., 1995). Neuronal wird EAAT2 im ausgereiften, gesunden Nervensystem nicht exprimiert, wohl aber während der Entwicklung und in pathologisch verändertem Gewebe (Danbolt, 2001). Allerdings scheint ein EAAT2 ähnlicher Transporter an der Wiederaufnahme präsynaptisch freigesetzten Glutamats beteiligt zu sein (O'Shea, 2002). Weiterhin sind EAA-Transporter im Rahmen der Glutathionsynthese auch an der Aufnahme von Cystin beteiligt, wie es am Beispiel von EAAT3 gezeigt werden konnte (Chen und Swanson, 2003).

Die Regulation dieser Transportsysteme erfolgt über eine Vielzahl endogener Mechanismen. So sind Glutamat und Glutamatagonisten in der Lage, die Menge und Kinetik der Glutamattransporter zu modulieren. Hierbei könnte Glutamat im Sinne eines hirneigenen Feedback-Mechanismus durch Induktion seiner eigenen Wiederaufnahme die glutamaterge Transmission selbst unterbrechen (Gegelashvili et al., 1996; Gegelashvili und Schousboe, 1997). Auch führt die Behandlung von Astrozytenkulturen mit ionotro-

pen oder Gruppe II metabotropen Glutamatrezeptoragonisten zu einer erhöhten EAAT1-Expression (Gegelashvili et al., 2000; ; Gegelashvili und Schousboe, 1997). Weiterhin kann eine Beeinflussung durch Glutamattransporter assoziierte Proteine (GTRAP) stattfinden. Hierdurch können sowohl die Expression und Aktivität gesteigert (Jackson et al., 2001), als auch verringert werden (Lin et al., 2001). Auch Phosphorylierungen über Proteinkinase C (PKC) und Glykosylierungen scheinen eine Rolle in der Regulation zu spielen. So zeigten Astrozyten nach PKA und PKC-Aktivierung z.B. durch Phorbol ester eine verstärkte Phosphorylierung und erhöhte Glutamataufnahme (Casado et al., 1993; ; Lortet et al., 1999). Dibutyryl-cAMP führt zur Steigerung der Glutamataufnahme in kultivierten Astrozyten (Gegelashvili et al., 1996). Die Proteinkinase A und Phosphatidylinositol-3-Kinase scheinen sich gleichsinnig auszuwirken (Davis et al., 1998; ; Lortet et al., 1999).

Verschiedene Neurotransmitter beeinflussen ebenfalls die Glutamataufnahme. Dopamin inhibiert die Aktivität der Glutamattransporter (Kerkerian et al., 1987), was möglicherweise durch die Absenkung des basalen cAMP verursacht wird. Eine Stimulation α -adrenerger Rezeptoren steigert die Glutamataufnahme in Astrozytenkulturen, wohingegen β -Rezeptor-Agonisten inhibitorisch wirken (Hansson und Ronnback, 1991). Von freien NO- und Sauerstoffradikalen ist bekannt, dass sie die Glutamataufnahme im Rattengehirn bzw. in Astrozytenkulturen vermindern (Pogun und Kuhar, 1994; ; Volterra et al., 1994). Diese Hemmung kann durch Arachidonsäure verstärkt werden (Volterra et al., 1994).

Nach der Behandlung von Astrozytenkulturen mit Östrogen konnte ebenfalls eine cAMP abhängige Steigerung der Glutamataufnahme durch vermehrte Expression von GLT1 gezeigt werden (Pawlak et al., 2005).

1.3.3 Glutamathomöostase nach experimentellem Hirntrauma

In verschiedenen tierexperimentellen Traumastudien wurde ein ausgeprägter posttraumatischer Anstieg exzitatorischer Aminosäuren, insbesondere des Glutamats beschrieben (Faden et al., 1989; ; Koizumi et al., 1997; ; Palmer et al., 1993; ; van Landeghem et al., 2001), der in der Penumbra auftritt und mit dem Nekrosewachstum assoziiert ist (Stoffel et al., 2002). Auch in Schädel-Hirn traumatisierten Patienten konnten erhöhte extrazelluläre Glutamatspiegel nachgewiesen werden (Stover et al., 1999). Dies beruht einerseits auf einer vermehrten Freisetzung intrazellulären Glutamats im Rahmen des

Zellunterganges, auf vermehrtem zytosolischem Efflux nach Membrandestabilisierung oder auf einer gesteigerten präsynaptischen Freisetzung. Darüber hinaus kommt es durch die Wirkung posttraumatischer Mediatoren wie z.B. freier Radikale zu einer Störung der Wiederaufnahme des Glutamates (Gegelashvili und Schousboe, 1997: ; Rao et al., 1998: ; van Landeghem et al., 2001).

Nach dem Konzept der Exzitotoxizität führt eine exzessive Aktivierung von Glutamatrezeptoren zu einer Nervenzellschädigung bis hin zum irreversiblen Untergang (Choi, 1992: ; Olney, 1969). Bei blockierter Aufnahme von Glutamat ist bereits die Konzentration von $1\mu\text{mol/l}$ exogenen Glutamats ausreichend, in vitro den Zelltod kortikaler Neurone auszulösen (Frandsen und Schousboe, 1990).

Diese Exzitotoxizität wird hauptsächlich durch ionotrope NMDA-Rezeptoren vermittelt (Schubert und Piasecki, 2001). Allerdings führt auch die posttraumatische Aktivierung von metabotropen Gruppe I Rezeptoren zu einer verstärkten Nervenzellschädigung, wohingegen Gruppe II und III Rezeptoren neuroprotektiv wirken (Allen et al., 1999).

Neben der Exzitotoxizität ist das Modell der oxidativen Glutamattoxizität ein ergänzender Erklärungsansatz für dessen nervenzellschädigende Wirkung. Über die Inhibition des Cystin-Glutamat-Antiporters blockieren hohe extrazelluläre Glutamatkonzentrationen die Cystinaufnahme. Durch die konsekutiv verminderte Glutathionsynthese erniedrigt sich die Toleranz gegen oxidativen Stress freier Radikale und es kommt zum Zelluntergang (Schubert und Piasecki, 2001).

Nach pharmakologischer Inhibition von Glutamattransportern in Zellkulturen tritt eine ausgeprägte Nervenzellschädigung auf (Rothstein et al., 1993). Im Mausmodell konnten nach selektiver Inhibition glialer Glutamattransporter neurodegenerative Veränderungen, motorische Defizite und epileptische Anfälle beobachtet werden (Rothstein et al., 1996). Knockout-Mäuse mit genetisch ausgeschalteten EAAT1 und EAAT2 Glutamattransportern zeigten eine Zunahme des Sekundärschadens nach Hirntrauma (Watase et al., 1998). Dementsprechend konnte auch durch ein funktionelles EAAT2 Knockout mittels antisense-Oligonukleotiden eine Vergrößerung des Nervenzellschadens nach fokalem Trauma beobachtet werden (Rao et al., 2001). In einem experimentellen Ischämiemodell hatte nur die Ausschaltung von EAAT2, nicht aber von EAAT3 eine Verschlechterung des neurologischen Outcomes zur Folge (Rao et al., 2001).

Nach einem experimentellen Hirntrauma findet eine Downregulation der Glutamattransporter statt. EAAT1 und EAAT2 sind innerhalb der ersten 6 bis 72 Stunden post Trauma vermindert nachweisbar (Rao et al., 1998). In Traumaversuchen an Ratten zeigte sich

ebenfalls eine posttraumatische Reduktion der Transporterexpression, wobei EAAT1 stärker betroffen war (van Landeghem et al., 2001). Auch in humanem Hirngewebe scheint die reduzierte astrozytäre Glutamataufnahme für posttraumatisch erhöhte Glutamatkonzentrationen verantwortlich zu sein. Es konnte gezeigt werden, dass es einerseits durch Astrozytendegeneration, andererseits durch Downregulation in verbleibenden Astrozyten zu einer Reduktion der EAAT1 und EAAT2 Expression bis zu 7 Tage nach kontusioneller Schädigung des Hirngewebes kommt (van Landeghem et al., 2006).

1.3.4 Neuroprotektion durch Glutamattransporterinduktion

Die Möglichkeit, durch Glutamattransporterinduktion einen neuroprotektiven Effekt zu erzielen, wurde auch von Rothstein et al. beschrieben. Im Tierversuch steigerten β -Laktam Antibiotika die Expression und die Aktivität von Glutamattransportern. Es konnte gezeigt werden, dass Ceftriaxon sowohl nach experimenteller Ischämie, als auch in Modellen neuronaler Degeneration neuroprotektiv wirkt und in ALS-Tiermodellen das Überleben der Versuchstiere steigert (Rothstein et al., 2005). Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass Ceftriaxon durch Induktion des Glutamattransporters GLT-1 im Mausmodell Symptome der Chorea Huntington besserte (Miller et al., 2008). Nach Gabe von einem FK 506 Derivat in vitro und in vivo konnte eine erhöhte EAAT2-Expression, die mit einer erhöhten Glutamattransportrate verbunden war, nachgewiesen werden. Dies führte zu einem neuroprotektiven Effekt in Zellkulturen und zu einer längeren Überlebenszeit von Versuchstieren in einem ALS-Modell (Ganel et al., 2006). Wie bereits an früherer Stelle erwähnt, führte auch die Behandlung von Astrozytenkulturen mit Östrogen durch verstärkte Glutamattransporterexpression und damit verbundener Erhöhung der Glutamataufnahme zu einer Protektion der Zellen.

1.4 Noradrenalin

1.4.1 Noradrenalin und SHT Management

In der konservativen Therapie des Schädel-Hirn-Traumas werden Katecholamine zur Stabilisierung des MABP und zur Aufrechterhaltung eines ausreichenden CPP eingesetzt. Nach posttraumatischer intravenöser Applikation von Noradrenalin (NA) an Rat-

ten konnten zerebraler Blutfluss und Gewebeoxygenierung zum Teil normalisiert werden, während sie in Kontrolltieren erniedrigt blieben (Kroppenstedt et al., 2000; Kroppenstedt et al., 2003). Es konnte auch gezeigt werden, dass sowohl eine Erniedrigung des MABP unter 70 mmHg (CPP <61 mmHg), als auch eine Erhöhung über 140 mmHg (CPP >121 mmHg) über einen Zeitraum von 3 Stunden zu einer Vergrößerung des Kontusionsvolumens nach 24 Stunden führt (Kroppenstedt et al., 1999)

In dieser frühen Phase finden sich ausgeprägte strukturelle und funktionelle Schädigungen der lokalen Gefäße (Daneyemez, 1999). Die maximale Blut-Hirnschrankenschädigung beginnt 4-8 Stunden post contusionem und hält bis zu 7 Tage an (Baskaya et al., 1997). Dies könnte mit der Gefahr einer erhöhten Gewebeeinblutung einhergehen. In der Untersuchung eines Patientenkollektivs (n=29) zeigte sich korrespondierend zur intravenösen NA Applikation eine Erhöhung des zerebralen Spiegels für Noradrenalin. Dieser Effekt schien unabhängig von einem strukturellen BHS-Schaden zu sein. Auch konnte kein schädigender Einfluss durch die systemische NA-Gabe nachgewiesen werden (Mautes et al., 2001).

1.4.2 Noradrenalin und Glutamat

In experimentellen Hirntraumastudien wurde ein Abfall der ipsilateralen parenchymatösen Noradrenalinkonzentration um 30% für mehr als 24 Stunden post Trauma gefunden. In der kontralateralen Hemisphäre normalisierten sich die Werte dagegen innerhalb von 24 Stunden (Prasad et al., 1994). Weiterhin konnte in in vitro-Studien gezeigt werden, dass Noradrenalin über die Aktivierung von α -Rezeptoren sowohl den depolarisationsinduzierten Kalziumeinstrom, als auch die Freisetzung von Glutamat hemmt (Crowder und Bradford, 1987). Diese neuroprotektive Wirkung von Noradrenalin könnte durch die posttraumatische Reduktion des zerebralen Noradrenalinpiegels abgeschwächt werden. Diese Annahme wird durch die Beobachtung gestützt, dass Substanzen, welche die präsynaptische Freisetzung von Noradrenalin erhöhen, das Outcome nach SHT verbessern, während Antagonisten des α_1 -Katecholaminrezeptors wie Phenoxybenzamin und Prazosin nach fokaler Kontusion in der Ratte den Heilungsverlauf verzögerten (Feeney und Sutton, 1987; Feeney und Westerberg, 1990).

Dieser Effekt könnte zumindest partiell durch eine Induktion von Glutamattransportern erklärt werden. An astrozytären Zellkulturen konnte bereits gezeigt werden, dass Noradrenalin die Glutamattransporterexpression induziert (Gegelashvili und Schousboe,

1997: ; Hansson und Ronnback, 1991). Fahrig et al. konnten eine dosis- und zeitabhängige Steigerung der Glutamataufnahme durch Noradrenalin nachweisen, die über α_1 -Rezeptoren vermittelt wird (Fahrig, 1993).

2 Fragestellung

Glutamat spielt eine zentrale Rolle in der Pathogenese des Sekundärschadens nach Schädel-Hirn-Trauma. Glutamattransporter sind maßgeblich an der Aufnahme überschüssigen Glutamats aus dem Extrazellulärraum beteiligt.

In der vorliegenden Arbeit soll untersucht werden, ob durch systemische Gabe von Noradrenalin ein neuroprotektiver Effekt im Sinne einer Verringerung des Kontusionsvolumens nach experimentellem SHT erzielt werden kann. Weiterhin wird der Einfluss der kontinuierlichen NA-Applikation auf das Expressionsverhalten von Glutamattransportern in vivo und die intrazerebrale Glutamatkonzentration untersucht.

Die hier gewonnenen Erkenntnisse könnten durch veränderte Indikationsstellungen für den Einsatz von Katecholaminen in der klinischen Behandlung von Patienten mit Schädel-Hirn-Trauma eine praktische Umsetzung erfahren.

3 Material und Methoden

3.1 Tierversuche

3.1.1 Versuchstiere

Als Versuchstiere wurden männliche Sprague-Dawley Ratten mit einem Gewicht zwischen 250 und 350g verwendet (n= 208; Charles River, Sulzfeld, Deutschland).

3.1.2 Controlled Cortical Impact Injury

Das Hirntrauma wurde mittels des Controlled Cortical Impact Injury appliziert. Dieses Modell einer fokalen Kontusion wurde erstmals von E. Dixon an Ratten beschrieben und wird aufgrund seiner vergleichsweise engen physiologischen Korrelation zu unfallbedingten Schädel-Hirn-Traumata sowie einer sehr guten Reproduzierbarkeit seither von

verschiedenen Forschergruppen eingesetzt (Dixon et al., 1991: ; Kiening et al., 2002: ; Kroppenstedt et al., 1999: ; Prasad et al., 1994). Der Versuchsaufbau besteht aus einer Kontusionseinheit mit Schlagbolzen, die über eine pneumatische Kontrollstation gesteuert wird. Unterhalb des Bolzens befindet sich ein dreidimensional verstellbarer Tisch, auf dem die präparierten Versuchstiere stereotaktisch fixiert werden. Die Kontusion wird durch den Aufschlag des pneumatisch beschleunigten Bolzens auf die Duraoberfläche erzeugt. Schnelle Abwärtsbewegung der Kontusionsstange, sowie langsame Aufwärtsbewegung werden durch ein Hochdruck- bzw. Niederdrucksystem erzeugt. Durch Einstellung variabler Druckstufen, Auslösezeitpunkte sowie Bolzentiefen sind Geschwindigkeit, Eindringtiefe, Auftreffwinkel sowie Durakontaktzeit frei veränderbar. Im vorliegenden Versuch wurde durch einen im rechten Winkel zur Dura und mit einer Geschwindigkeit von 7 m/s auftreffenden Schlagbolzen mit einem Durchmesser von 5 mm ein Primärtrauma mittlerer Schwere im Bereich des linken parieto-temporalen Kortex appliziert. Die Eindringtiefe betrug 2 mm. In dieser Arbeit ist ein Trauma mittlerer Schwere als eine Kontusion definiert, die ausschließlich den cerebralen Kortex betrifft, ohne tiefergelegene Hirnstrukturen wie Hippokampus oder Thalamus primär zu beschädigen. Eine Verletzung der Dura mater vor oder während der Traumatisierung führte zum Ausschluss des Versuchstieres.

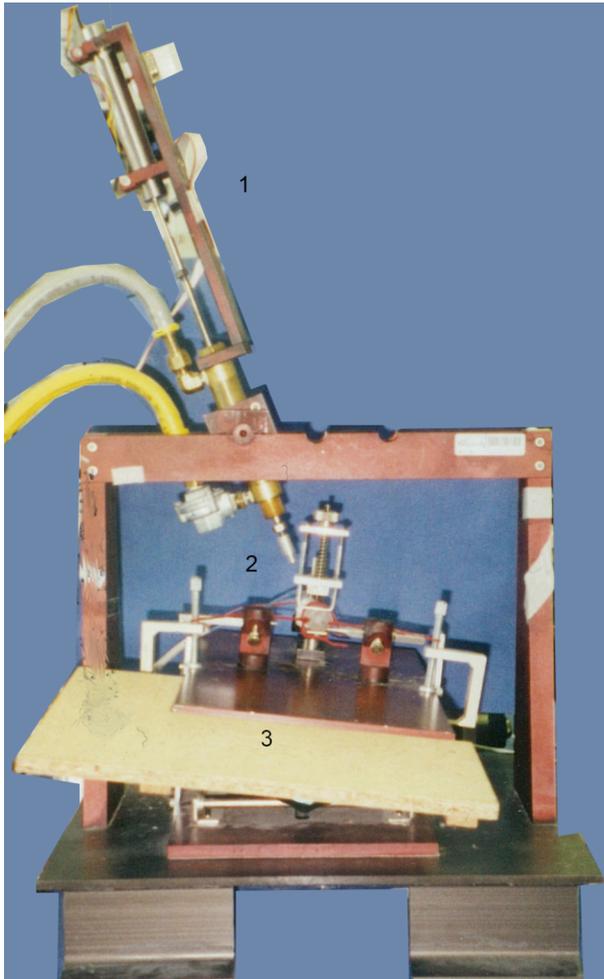


Abbildung 1: Traumamodell des Controlled Cortical Impact. Die Kontusionseinheit besteht aus dem am Stahlrahmen fixierten Kontusionsschlitten (1) mit Schlagbolzen (2) und dem höhenverstellbaren Tisch mit stereotaktischer Halterung, in welcher die Versuchstiere fixiert werden (3).

3.1.3 Anästhesie und chirurgische Präparation der Versuchstiere

Während einer 5 Minuten dauernden Induktionsperiode wurden die Versuchstiere in einer geschlossenen Induktionskammer mit einem Gasgemisch aus 5 Vol% Isofluran, 1l/min N₂O und 0,5l/min O₂ narkotisiert. Anschließend wurden die spontanatmenden Ratten umgelagert und auf dem Präparationstisch fixiert. Die Erhaltungsnarkose mit einem reduzierten Gasgemisch (1,5 Vol% Isofluran, 0,5 l/min N₂O, 0,3 l/min O₂) wurde über eine Maske appliziert. Eine adäquate Analgesie und Anästhesie wurde als ein Fehlen der Retraktion einer Hinterpfote auf Schmerzreiz definiert und sowohl vor Beginn als auch während der chirurgischen Präparation regelmäßig überprüft.

Aufgrund eines dosisabhängigen vasodilatierenden Effektes wurde die Isoflurankonzentration zu allen untersuchten Zeitpunkten konstant gehalten. Dabei tritt mit der hier verwendeten Konzentration von 1,5 Vol% bei ausreichender Anästhesie die geringstmögliche Dilatation zerebraler und systemischer Gefäße auf (Conzen et al., 1992).

Zunächst erfolgte die Darstellung und Kanülierung der rechten Arteria femoralis mit einem Polyethylenkatheter (Fa. Braun, Melsungen, Deutschland) durch einen Zugang über die Leistenregion. Durch die Verbindung mit einer Transpac-Einheit (Fa. Abbott, Deutschland) wurde fortlaufend der arterielle Blutdruck gemessen und im Versuchsprotokoll erfasst. Weiterhin konnten über diesen Zugang zu definierten Zeitpunkten arterielle Blutproben zur Analyse von pO_2 , pCO_2 , pH, HCO_3 , base excess sowie Hb entnommen werden (ABL 520, Radiometer, Kopenhagen). Die Blutglucosekonzentration wurde mittels Schnelltest bestimmt (Accu-Chek Sensor, Fa. Roche Diagnostics, Deutschland). Die Präparation erfolgte mithilfe eines Operationsmikroskopes (Fa. Zeiss, Deutschland), um die Gefäße selbst und insbesondere den N. femoralis weitgehend zu schonen.

Anschließend wurde der Kopf der Versuchstiere zur Trepanation des Schädels in Bauchlage stereotaktisch fixiert. Danach erfolgte die mediane Inzision der Kopfhaut unter Lokalanästhesie mit 2%igem Lidocain (Fa. Braun, Deutschland) in einer Länge von ca. 3 cm. Nach Resektion des linken M. temporalis, der Galea und des Periosts wurde innerhalb der Grenzen von Sagittalnaht, Lambdanaht, linker Koronarnaht und des Arcus zygomaticus eine osteoklastische Trepanation der linken parieto-temporalen Kalotten-seite durchgeführt. Kalotte sowie Dura wurden zur Kühlung und Reinigung kontinuierlich mit 0,9%iger Natriumchloridlösung gespült. Um Duraverletzungen vorzubeugen bzw. zu erkennen, wurde auch hier das Operationsmikroskop eingesetzt. Danach wurden die Versuchstiere erneut umgelagert und auf dem Kontusionstisch des Traumagerätes stereotaktisch fixiert, dessen Einstellung ein orthogrades Auftreffen des Schlagbolzens ermöglichte. Die Kontusionsstange wurde maximal ausgefahren und der Schlagbolzen mit der Dura mater in Kontakt gebracht. Nach Einstellung der definierten Eindringtiefe von 2 mm wurde die Kontusion ausgelöst. Nach Hautverschluss (3-0 Prolene, Fa. Ethicon, Deutschland) und Narkoseausleitung wurden die Tiere wach zurück in die Käfige gesetzt. Während des gesamten Versuches wurde die Körpertemperatur der Tiere über eine rektale Sonde erfasst und mittels einer automatischen elektrischen Wärmematte zwischen 37°C und 38°C stabil gehalten.



Abbildung 2: Operativer Situs mit Darstellung der Kalotte (a), linksseitiger Kraniotomie bei Zustand vor CCI (b) und nach CCI (c).

3.1.4 Intravenöse Noradrenalininusion

Die Testsubstanz Noradrenalin wurde in 0,9% NaCl gelöst und intravenös durch osmotische Minipumpen appliziert (Alzet mini osmotic pumps, model 2001, Fa. Alzet, USA).

Die Außenhülle der osmotischen Minipumpen besteht aus einer semipermeablen Membran, die eine osmotisch aktive Schicht einhüllt. Im Inneren der Pumpen befindet sich ein abgeschlossenes Flüssigkeitsreservoir, welches über eine Öffnung am apikalen Pumpenende mit der Testsubstanz befüllt werden kann. Anschließend können die Pumpen an der vorgesehenen Stelle in den Organismus implantiert werden.

Nach der Implantation kann freies Wasser aus dem Interstitium über die semipermeable Außenhülle in die osmotische Schicht eindringen. Dadurch nimmt das Volumen dieser Schicht zu, sodass das innere, mit der Testsubstanz gefüllte Flüssigkeitsreservoir komprimiert wird. Auf diese Weise entsteht ein kontinuierlicher Abstrom der Testsubstanz aus dem Reservoir über die Öffnung im apikalen Teil der Pumpe. In dem verwendeten Modell betrug die Flussrate $1\mu\text{l/h}$ bei einer maximalen Füllmenge von $200\mu\text{l}$.

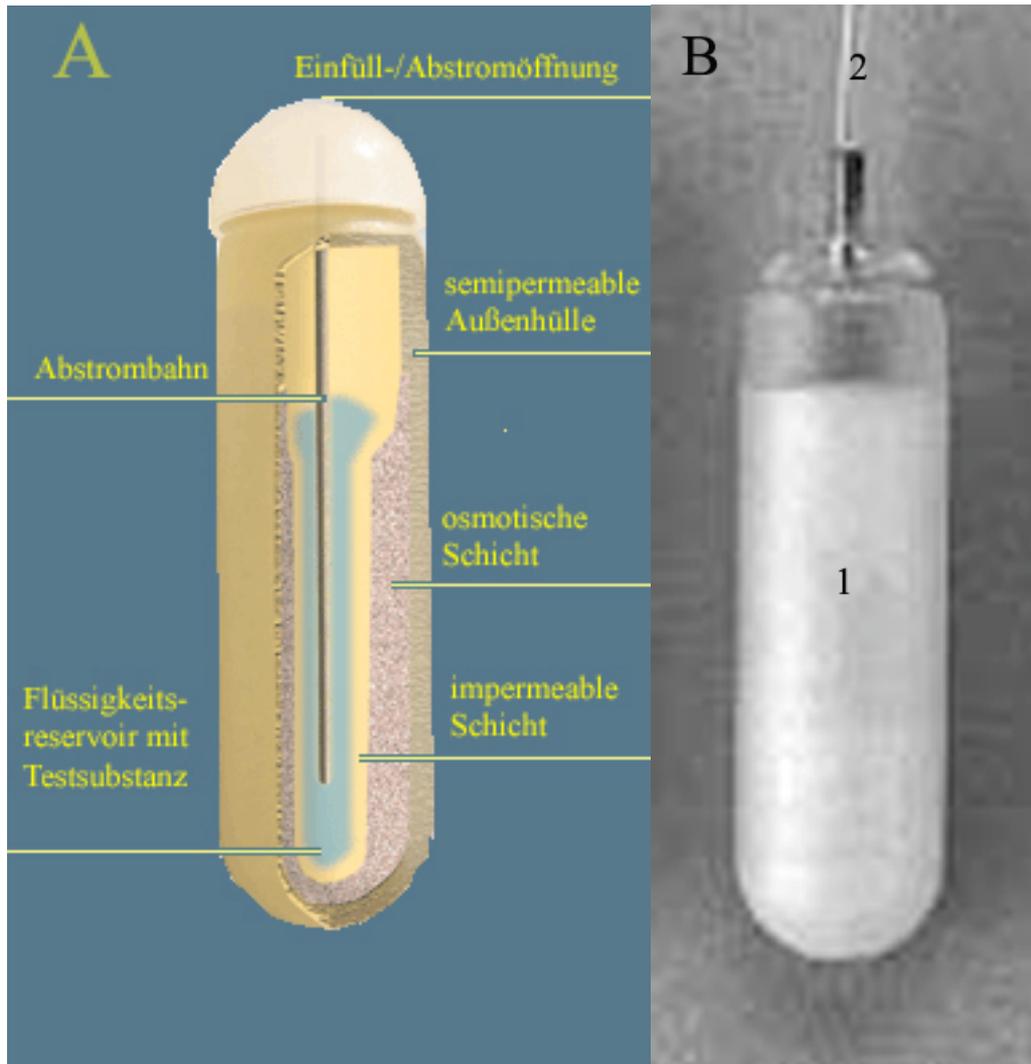


Abbildung 3: A - schematische Darstellung der osmotischen Minipumpe mit den im Text beschriebenen Komponenten, B – osmotische Minipumpe (1), die Abstromöffnung ist mit einem Polyethylenkatheter konnektiert, der wie beschrieben in die Blutgefäße der Versuchstiere implantiert werden kann (2)

Die Menge der pro Zeiteinheit applizierten Substanz ist bei stabiler Flussrate über eine Konzentrationsänderung möglich und konnte so in den verschiedenen Versuchsgruppen variiert werden. Gemäß den Herstellerangaben sind die Pumpen ca. 24 Stunden vor Versuchsbeginn befüllt und am apikalen Ende mit einem ca. 3cm langen Polyethylenkatheter konnektiert worden. Vor der 24stündigen Inkubation bei 37°C in 0,9% NaCl wurde die korrekte Befüllung durch Vergleich mit dem Leergewicht geprüft. Die Funktionsfähigkeit der Pumpen wurde festgestellt, wenn nach Inkubation keine Luftblasen sichtbar waren und sich das Flüssigkeitsniveau im angeschlossenen Katheter deutlich erhöht hatte.

4 Stunden nach Applikation des Traumas erfolgte eine erneute Narkose und Kanülierung der A. femoralis zur Blutdruckaufzeichnung und Probengewinnung. Anschließend wurden die mit einer Noradrenalin-Lösung (Sigma-Aldrich, USA) befüllten osmotischen Minipumpen über den angeschlossenen Katheter in die V. femoralis implantiert und fixiert. Die Pumpen wurden subkutan in der Leistenregion platziert. Nach dem Wundverschluss wurden die Tiere erneut in die Käfige gesetzt.

In einer erneuten Operation nach 24 Stunden wurde die korrekte Lage der Infusionspumpen kontrolliert sowie erneut eine Blutdruckmessung und Blutprobenentnahme durchgeführt.

3.1.5 Tötung, Hirnentnahme, Gewebsaufbereitung

Die Tötung der Tiere erfolgte durch Ausbluten nach Inzision der linken Nierenvene in tiefer Inhalationsnarkose. Anschließend wurde die Schädeldecke vollständig entfernt und das Gehirn in toto entnommen. Es erfolgte entweder die sofortige Konservierung in flüssigem Stickstoff für die Proteinanalyse oder eine Fixierung in 4% Paraformaldehydlösung (PFA). Nach Ablauf von 24 Stunden wurden die in PFA behandelten Hirne entwässert und für die volumetrische Untersuchung in Paraffin eingebettet,

3.2 Akutversuche - Vergleich verschiedener Noradrenalinkonzentrationen

In vorgelagerten Experimenten wurde die Auswirkung verschiedener Noradrenalin Konzentrationen auf den arteriellen Mitteldruck (MABP) sowie die Traumagröße der Versuchstiere (n=28) getestet (van Landeghem et al., 2003). Nach Kanülierung der A. femoralis zeichnete hierzu ein Monitor (Servomed, Hellige, Deutschland) die systolischen (SABP) und diastolischen (DABP) Blutdruckwerte kontinuierlich auf und berechnete den MABP basierend auf der Formel: $MABP = (SABP + 2 \times DABP) / 3$.

Die Tiere wurden, wie im vorhergehenden Kapitel beschrieben, traumatisiert. Die Infusion von Noradrenalin begann 4 Stunden post contusionem und endete mit der Hirnentnahme 48 Stunden nach Traumatisierung. Das infundierte Volumen betrug 44µl. Noradrenalin wurde in 3 verschiedenen Konzentrationen verabreicht: 0,15 µg/kg/min

(niedrig), 0,3 µg/kg/min (mittel), 1 µg/kg/min (hoch) (je n=7). Ebenfalls traumatisierte Kontrolltiere (n=7) erhielten ein identisches Volumen einer 0,9% NaCl-Lösung.

Invasive arterielle Blutdruckmessungen, Blutgasanalysen sowie Gewichtskontrollen erfolgten vor dem Trauma (v.T.), nach der Pumpenimplantation (4h), nach 24 Stunden (24h) und unmittelbar vor der Tötung nach 48 Stunden (48h).

3.2.1 Kontusionsvolumen und intrazerebrales Blutvolumen

Die Hirne wurden nach Entnahme für 24 Stunden in PFA fixiert und anschließend in koronarer Schnittrichtung in 2 mm große Blöcke getrennt. Nach Paraffinierung wurden jeweils 3 Schnitte je Tier mit einer Schichtdicke von 4µm auf Poly-L-Lysin beschichtete Objektträger aufgezogen und mit Hämatoxylin und Eosin (H&E) (Slusher et al., 1999) gefärbt. Die lichtmikroskopische Untersuchung erfolgte mit einem Leica DMRB Mikroskop (Fa. Leica, Deutschland). Die kontusionierten Areale waren durch eine deutlich verminderte Färbung im Vergleich zum umgebenden nichtverletzten Kortex leicht zu identifizieren. Die kortikale Kontusion sowie intraparenchymale Blutungen wurden auf drei verschiedenen Ebenen (-5,6 mm, -3,8 mm und 1 mm relativ zum Bregma) bestimmt (van Landeghem et al., 2001). Jeweils drei koronare Schnitte einer Ebene im Abstand von 100µm sind mittels einer angeschlossenen Kamera (Fa. Leica, Deutschland) digitalisiert und semiquantitativ analysiert worden. Das Volumen von zerebraler Kontusion und intraparenchymaler Blutung wurden bestimmt, indem die jeweilige Fläche mit der Schichtdicke multipliziert wurde. Blutungs- und Nekroseflächen der Einzelbilder wurden zuvor planimetrisch vermessen (Sigma Scan Pro, SPSS, USA). Nach der folgenden Formel wurde das Kontusionsvolumen um das posttraumatische Ödem korrigiert:

Korrigiertes Kontusionsvolumen = Volumen der kontralateralen Hemisphäre – (Volumen der ipsilateralen Hemisphäre – gemessenen Kontusionsvolumen)

Die morphometrische Analyse wurde von 2 unabhängigen Untersuchern (Schreiber, van Landeghem) ohne Kenntnis des jeweiligen Tierstatus durchgeführt.

3.2.2 Nicht-invasive Blutdruckmessung-SABP

Zum Ausschluss möglicher narkosebedingter Beeinflussungen des MABP wurde in einer zweiten Versuchsreihe der arterielle Blutdruck nicht-invasiv mittels der tail-cuff Methode bestimmt. Hierbei komprimiert ähnlich wie bei der Methode nach Riva Rocci eine Blutdruckmanschette die Schwanzgefäße der Versuchstiere mit einem Druck, der oberhalb des systolischen Blutdruckes liegt. Während schrittweiser Druckverminderungen wird dann über einen hochsensitiven optischen Pulssensor das Wiederauftreten der Pulskurve erfasst und mithilfe eines automatischen Blutdruckmonitors verarbeitet (TSE Blood Pressure Monitor 9002, TSE, Deutschland). Aufgrund der hohen Empfindlichkeit der Pulskurvenaufzeichnung, die durch Bewegungs- und Temperaturartefakte leicht gestört werden kann, werden nur SABP-Veränderungen erfasst (van Landeghem et al., 2003; ; Wen et al., 1988).

Nach einer Vorbereitungszeit von 2 Wochen mit zunächst 2täglichem, ab der 2. Woche täglichem Training der Tiere zur Eingewöhnung in den Versuchsablauf, erfolgten Traumatisierung und Pumpenimplantation wie in den vorhergehenden Kapiteln beschrieben (n=12). Die Pumpen waren, wie zuvor beschrieben, mit 0,9% NaCl bzw. Noradrenalin in niedriger, mittlerer oder hoher Dosierung befüllt (je 3 Tiere pro Gruppe). Zur Stressvermeidung fanden weder repetitive invasive Druckmessungen noch andere Operationen zwischen Traumatisierung und Tötung der Tiere statt. Der SABP wurde an wachen Ratten vor CCII sowie 1, 4, 24 und 48 Stunden danach gemessen. Die durchschnittlichen Messwerte einer Gruppe ergaben sich aus dem Median von 4 Einzelmessungen pro Zeitpunkt und Tier. Die Hirne der Tiere dieser Gruppe sind aufgrund des veränderten Versuchsprotokolls nicht analysiert worden.

3.3 Langzeitversuche – Auswirkungen kontinuierlicher niedrig-dosierter Noradrenalininfusion

In einer weiteren Reihe von Versuchen sollte die Auswirkung einer kontinuierlichen Noradrenalingabe auf das Kontusionsvolumen sowie die Expression von Glutamattransportern insbesondere nach längeren Überlebenszeiten untersucht werden. Die Versuchstiere (n=108) wurden nach dem bereits beschriebenen Protokoll traumatisiert (CCII) und erhielten eine osmotische Minipumpe. Tötung und Hirnentnahme erfolgten nach Überlebenszeiten von 48 Stunden, 7 Tagen und 4 Wochen. Ausgehend von den Ergebnissen der vorhergehenden Versuche wurde mit 0,15 µg/kg/min die Noradrenalin-

konzentration gewählt, bei der eine Verringerung des Kontusionsvolumens nachgewiesen wurde, ohne dass es zu einer Zunahme des MABP oder intrazerebralen Blutvolumens gekommen war.

Die Versuchstiergruppe setzte sich aus 72 traumatisierten und 36 scheinoperierten Ratten zusammen. Die scheinoperierten Tiere wurden nach einem identischen Versuchsprotokoll behandelt, erhielten jedoch nach osteoklastischer Trepanation kein fokales Trauma. Die Anzahl der Zwischenoperationen sowie die summierte Narkosezeit waren in dieser Gruppe gleich.

Je 12 der 24 pro Überlebenszeit (ÜZ) traumatisierten Versuchstiere erhielten eine Noradrenalin oder NaCl Infusion. Die Konservierung der Hirne erfolgte alternierend in flüssigem Stickstoff oder PFA, sodass pro Untersuchungszeitpunkt jeweils 6 kontusionierte Tiere zur volumetrischen Analyse oder für die Proteinbestimmung zur Verfügung standen. Entsprechend wurden pro Überlebenszeit jeweils 3 Hirne scheinoperierter Tiere für die weiteren Untersuchungen konserviert.

Invasive arterielle Blutdruckmessungen, Blutgasanalysen sowie Gewichtskontrollen erfolgten auch hier vor dem Trauma (v.T.), nach der Pumpenimplantation (4h), nach 24 Stunden (24h) sowie unmittelbar vor der Tötung nach 48 Stunden (48h), 7 Tagen (7d) oder 4 Wochen (4W). Abweichend vom bisher Beschriebenen wurde bei den Versuchstieren mit längerer Überlebenszeit (4W) nach 7 Tagen eine zusätzliche Operation zur Entfernung der subkutan implantierten Pumpen durchgeführt, die zu diesem Zeitpunkt ihre maximale Infusionsdauer erreicht hatten. Somit betrug die Gesamtinfusionszeit der einzelnen Gruppen: 48 Stunden (ÜZ 48h) bzw. 7 Tage (ÜZ 7d + ÜZ 4W).

3.3.1 Semiquantitative Bestimmung der Glutamatkonzentration (Western Blot)

Für die Western Blot Analyse wurden die Hirne unmittelbar nach Entnahme in koronarer Schnitfführung in 2mm dicke Blöcke zerteilt. Aus jedem Block wurden Kontusion und perikontusionelles kortikales Hirngewebe abgetrennt und sofort in flüssigem Stickstoff gefroren.

Zur Proteinextraktion wurden die bei -80°C gelagerten Proben zunächst mechanisch, dann unter Zugabe der Extraktionslösung, bestehend aus Lysispuffer (je 100ml: 0,79g Tris HCl, 0,88g NaCl, 1g Nonidet P40, 0,5g Deoxycholat) und Proteaseinhibitoren (protease inhibitor cocktail, Sigma-Aldrich, Deisenhofen) im Ultraschallbad zerkleinert und

anschließend bei 10G für 10 min zentrifugiert. Der Überstand aus insgesamt 3 Durchgängen wurde abpipettiert und gepoolt. Für die anschließende Bestimmung der Proteinkonzentration nach der Biuret-Methode wurden 100µl Proteinlysate mit 1ml BCA Protein Assay Reagent Kit (Pierce, Bonn) im Wasserbad inkubiert. Daraufhin wurden photometrisch die von der Proteinkonzentration abhängigen Absorbationswerte ermittelt. Anhand einer vorher aus bekannten Proteinkonzentrationen erstellten Eichkurve konnten dann die dazugehörigen Proteinkonzentrationen abgelesen werden. Die später verwendeten Konzentrationwerte jedes Lysates stellen den Mittelwert aus 3 unabhängigen Messungen dar.

Zur elektrophoretischen Trennung der Proteine wurden jeweils gleiche Proteinmengen auf 12 % SDS/Polyacrylamid-Gele aufgetragen. Die Auftrennung sowie der anschließende Blottransfer fanden in einem NuPage Gelelektrophorese System statt (Invitrogen, Groningen, Niederlande). Zum Immunoblotting inkubierten die Blots entweder mit dem Antikörper gegen EAAT1 (Verdünnung 1:100) oder EAAT2 (1:50) (Novocastra Lab., Newcastle upon Tyne, Großbritannien). Die antikörpergebundenen Proteinbanden wurden über Peroxydase-konjugiertes StreptAvidin (Sigma; 1:1000) und das Enhanced-Chemiluminescence-System (ECL; Amersham, USA) detektiert. Nach dem Einscannen der belichteten ECL-Filme (Agfa, Germany) wurde die Intensität der Proteinbanden densitometrisch analysiert (SigmaScan Pro, SPSS, USA). Pro untersuchtes Tier und Antikörper wurden 2 unabhängige Western Blots angefertigt, die jeweils dreimal densitometrisch untersucht wurden. Die Mittelwerte gingen in die Auswertung ein.

3.4 Mikrodialyse

In einem eigenständigen Versuchsaufbau wurden mithilfe der intrazerebralen Mikrodialyse die postkontusionellen Veränderungen des Hirnstoffwechsels untersucht. Diese Methode wurde 1990 von Hillered et al. und Meyerson et al. zur Analyse intrazerebraler neurochemischer Prozesse in die klinische Neurochirurgie eingeführt (Hillered et al., 1990; Meyerson et al., 1990). Basierend auf dem Dialyseprinzip fungiert der Katheter als künstliche Kapillare innerhalb des Hirnparenchyms. Diese Methode ermöglicht die Messung pathophysiologischer Veränderungen mit einer hohen örtlichen und bei kontinuierlicher Anwendung auch hohen zeitlichen Auflösung (Engstrom et al., 2005; Hamani et al., 1997) und ist zum Neuromonitoring von bewusstseinsgetriebenen Patienten

mit Schädel-Hirn-Trauma oder Subarachnoidalblutung auch im klinischen Alltag anerkannt (Bellander et al., 2004).

Die hier verwendete CMA 11 Mikrodialyseeinheit (CMA Microdialysis, Stockholm, Schweden) besteht aus einem 7 mm langen Doppellumenkatheter, an dessen Spitze sich eine semipermeable Membran mit einem Durchmesser von 0,24 mm befindet. Als Perfusat wird künstlicher Liquor über den anterograden Schenkel infundiert. Während dieser die semipermeable Membran an der Katheterspitze passiert, findet der Konzentrationsausgleich mit dem Interstitium statt. Anschließend wird das Dialysat über die innere Membran in retrograder Richtung abtransportiert und gesammelt. Die gewonnenen Proben können anschließend durch HPLC oder wie im vorliegenden Versuch mit dem CMA 600 Microdialysis Analyzer (CMA Microdialysis, Stockholm) enzymchemisch untersucht werden. Häufig untersuchte Parameter repräsentieren als Biomarker den posttraumatischen Zelluntergang (Glycerol), das Ausmaß der Exzitotoxizität (Glutamat) oder den postischämisch veränderten Glucosestoffwechsel (Glucose, Pyruvat, Laktat) und repräsentieren in ihrer Gesamtheit das Ausmaß des sekundären Hirnschadens (Enblad et al., 2001: ; Hillered et al., 2005: ; Unterberg et al., 2001).

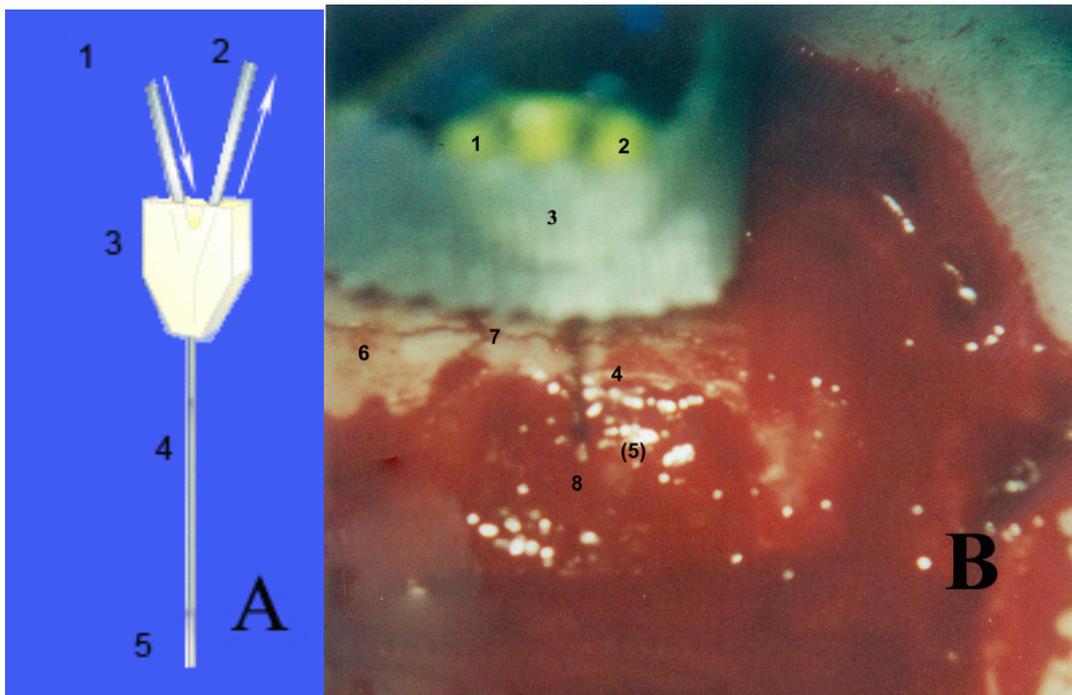


Abbildung 4: A - schematische Darstellung des Mikrodialysekatheters mit antegradem – (1) und retrogradem Schenkel (2), Corpus (3), doppelumigem Schaft (4) sowie Katheterspitze (5), B – operativer Situs nach Kraniektomie mit implantierter Mikrodialysesonde; im Vordergrund erkennt man den gelben Corpus des Mikrodialysekatheters; die Markierungen 1 – 5 entsprechen den in Abb. A, die Katheterspitze befindet sich subdural und ist nicht zu erkennen; weitere Landmarken: Sagittalnaht (6), Coronarnaht und Bregma (7), Kalottendefekt mit Aufsicht auf die Dura mater (8).

Allerdings ist die Konzentration der untersuchten Parameter im Dialysat nicht allein Resultat der Differenz zwischen Interstitium und Perfusat, sondern abhängig von der Porengröße der Membran, Flussgeschwindigkeit und Membranlänge sowie der zu untersuchenden Substanz selbst. Um die Genauigkeit der Messergebnisse zu erhöhen, wurde daher vor (ivr1) und nach jeder Messung (ivr2) die in „vitro recovery rate“ (= ivr) der Membran für jeden untersuchten Parameter bestimmt und gemittelt. Hierzu wurde in vitro eine Lösung bekannter Konzentration dialysiert (Calibrator A, CMA Microdialysis). Die „Recovery Rate“ ergibt sich aus dem Quotienten aus wahrer Konzentration der Messlösung und gemessener Konzentration des Dialysates. Die folgende Formel zeigt die Berechnung der wahren intrazerebralen Konzentrationen:

Wahre Konzentration = Konzentration der Kalibratorlösung / (ivr1 + ivr2)/2 x gemessene Konzentration

Eine separate Gruppe Versuchstiere (n= 60) wurde nach dem bereits beschriebenen Protokoll traumatisiert bzw. scheinoperiert (je n=30). Die Implantation der osmotischen Pumpen, befüllt mit entweder Noradrenalin oder NaCl (je n=30), erfolgte ebenfalls wie beschrieben 4 h nach dem Trauma. Nach definierten Überlebenszeiten von 4, 24 und 48 Stunden nach dem Trauma (je n=20) erfolgte die Mikrodialyse. Den narkotisierten Tieren wurde der Mikrodialysekatheter im Bereich der vermuteten Penumbra unter Verwendung standardisierter Koordinaten (relativ zum Bregma: A -2,3 mm, M -1,2 mm, V – 1,5 mm) implantiert. Die Perfusion des Katheters erfolgte mit künstlichem Liquor bei einer Flussrate von 2µl/min. Um einen implantationsbedingten Anstieg der untersuchten Parameter auszuschließen, wurde das Dialysat der ersten 30 Minuten verworfen. Das Gesamtdialysat der folgenden 30 min wurde zunächst bei -80°C aufbewahrt und zu einem späteren Zeitpunkt analysiert. Anschließend erfolgte die Tötung der Tiere.

3.5 Statistische Auswertung

Die Daten werden nach Testung auf Normalverteilung als Mittelwerte \pm Standardfehler der Mittelwerte angegeben. Tests auf Signifikanz wurden mit dem gepaarten oder ungepaarten t-Test durchgeführt. Die Signifikanztestung der physiologischen Parameter erfolgte unter Anwendung der einseitigen Varianzanalyse (ANOVA) und entsprechender Posttests (Bonferroni). Die gesamte statistische Auswertung erfolgte mit den Programmen SIGMA STAT 2.0 oder SPSS 11.5 (SPSS, USA). Unterschiede wurden bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit unter 5% ($p < 0,05$) als signifikant betrachtet.

4 Ergebnisse

4.1 Akutversuche – Vergleich verschiedener Noradrenalinkonzentrationen

Untersucht wurde die Wirkung von kontinuierlich appliziertem Noradrenalin auf Blutdruck, physiologische Parameter, Kontusionvolumen und intraparenchymales Blutungsvolumen nach einer Überlebenszeit von 48 Stunden. Noradrenalin wurde in niedriger (0,15 µg/kg/min), mittlerer (0,3 µg/kg/min) und hoher 1,0 µg/kg/min) Dosis appliziert.

Weiterhin werden die Konzentrationen extrazellulärer Aminosäuren nach kontinuierlicher niedrigdosierter Noradrenalininfusion nach posttraumatischen Überlebenszeiten bis zu 48 Stunden dargestellt.

4.1.1 Hb, Glucose, pH, Blutgase

Parameter	Substanzgruppen NaCl bzw. No- radrenalin in $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$	Vor Trauma	4 Stunden nach Trauma	24 Stunden nach Trauma	48 Stunden nach Trauma
pH	NaCl	$7,44 \pm 0,05$	$7,44 \pm 0,05$	$7,49 \pm 0,03$	$7,44 \pm 0,05$
	Nor 0,15	$7,49 \pm 0,02$	$7,43 \pm 0,02$	$7,46 \pm 0,04$	$7,46 \pm 0,02$
	Nor 0,3	$7,45 \pm 0,45$	$7,40 \pm 0,03$	$7,46 \pm 0,04$	$7,43 \pm 0,04$
	Nor 1,0	$7,47 \pm 0,47$	$7,38 \pm 0,05$	$7,5 \pm 0,05$	$7,49 \pm 0,04$
pCO₂ mmHg	NaCl	35 ± 3	33 ± 5	31 ± 1	34 ± 4
	Nor 0,15	32 ± 1	37 ± 3	36 ± 4	34 ± 2
	Nor 0,3	37 ± 2	38 ± 3	34 ± 3	38 ± 3
	Nor 1,0	34 ± 3	40 ± 8	33 ± 6	33 ± 5
pO₂ mmHg	NaCl	125 ± 27	136 ± 22	133 ± 36	126 ± 22
	Nor 0,15	97 ± 20	106 ± 7	114 ± 26	108 ± 28
	Nor 0,3	132 ± 29	129 ± 35	141 ± 27	156 ± 30
	Nor 1,0	116 ± 32	115 ± 30	123 ± 40	142 ± 37
HCO₃⁻ mmol/l	NaCl	26 ± 2	25 ± 2	25 ± 1	24 ± 1
	Nor 0,15	25 ± 2	25 ± 1	26 ± 1	25 ± 1
	Nor 0,3	26 ± 1	24 ± 1	26 ± 2	26 ± 1
	Nor 1,0	25 ± 2	23 ± 2	27 ± 2	26 ± 1
Hb mg/dl	NaCl	12 ± 1	13 ± 2	11 ± 1	11 ± 1
	Nor 0,15	13 ± 1	14 ± 2	12 ± 1	12 ± 1
	Nor 0,3	13 ± 1	13 ± 1	12 ± 1	13 ± 1
	Nor 1,0	13 ± 2	14 ± 2	12 ± 1	12 ± 2
Glucose mg/dl	NaCl	153 ± 15	142 ± 32	141 ± 38	156 ± 26
	Nor 0,15	179 ± 58	169 ± 32	153 ± 28	154 ± 51
	Nor 0,3	135 ± 25	154 ± 43	132 ± 23	135 ± 29
	Nor 1,0	223 ± 34	226 ± 55	193 ± 62	176 ± 73

Tabelle 1: Blutgase, Hämoglobinkonzentration, und Blutzuckerspiegel wurden durch die kontinuierliche Infusion von Noradrenalin in verschiedenen Konzentrationen nicht beeinflusst.

Während des gesamten Versuches blieben die untersuchten Parameter pH, pCO₂, pO₂, HCO₃⁻, sowie Hämoglobin- und Glucosekonzentration innerhalb normaler Werte. Innerhalb der verschiedenen Versuchsgruppen gab es keine signifikanten Unterschiede. Die höchsten Blutglucosekonzentrationen (226 ± 55 mg/dl) traten in der Gruppe mit der höchsten Noradrenalkonzentration auf ($1,0$ $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$), jedoch erreichte auch hier der Unterschied keine statistische Signifikanz.

4.1.2 Blutdruck

4.1.2.1 Invasive Blutdruckmessung – MABP

Der mittlere arterielle Blutdruck (MABP) aller Versuchstiere vor der Traumaapplikation betrug 95 ± 9 mmHg. Zu allen Messzeitpunkten kam es in der Gruppe der Noradrenalin behandelten Tiere zu keiner signifikanten Erhöhung des MABP im Vergleich zu Versuchstieren, die eine NaCl Infusion erhielten.

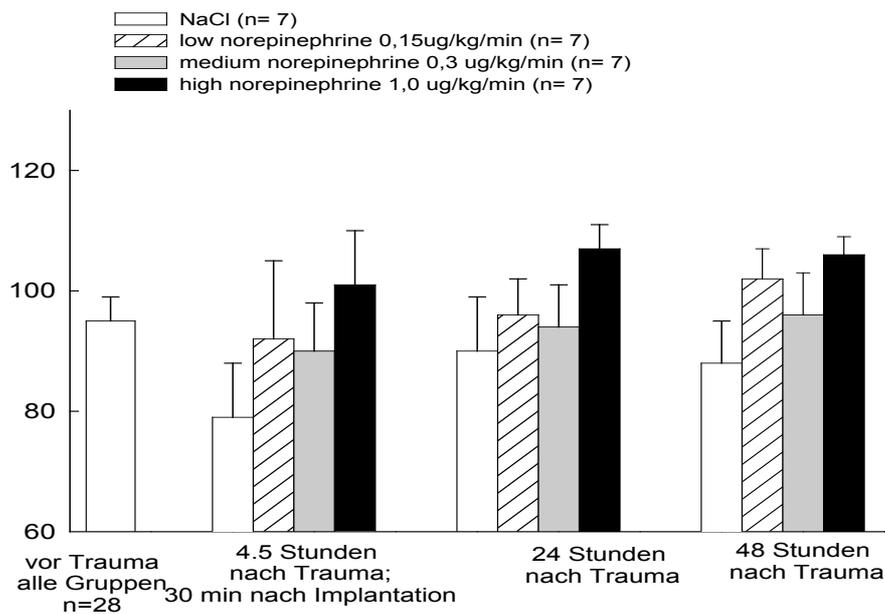


Abbildung 5: Einfluss einer kontinuierlichen Noradrenalininfusion auf den MABP in narkotisierten Ratten. Abgesehen von einer nicht signifikanten Tendenz zu erhöhten Werten in der Hochdosisgruppe bleibt der MABP verglichen mit Werten vor dem Trauma sowie mit NaCl-Tieren unverändert.

Es scheint eine Tendenz zu erhöhten MABP-Werten nach hochdosierter Noradrenalininfusion zu geben. Die Werte unterscheiden sich jedoch nicht signifikant von denen der anderen Versuchsgruppen. Die durchschnittlichen Werte liegen unterhalb 120 mmHg und entsprechen damit denen in wachen Ratten (Moreau et al., 1998).

4.1.2.2 Nicht invasive Blutdruckmessung – SABP

Bereits nach Infusion von Noradrenalin in mittlerer Dosierung ($0,3 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$) war der systolische arterielle Blutdruck (SABP) 4,5 sowie 24 Stunden nach dem Trauma signifi-

kant erhöht. In der Hochdosisgruppe (1 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$) war der SABP 24 und 48 Stunden nach Trauma im Vergleich zu Kontrollgruppe signifikant erhöht. In Ratten, die Noradrenalin niedrigdosiert erhielten (0,15 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$), blieb der SABP zu allen untersuchten Zeitpunkten innerhalb normaler Werte.

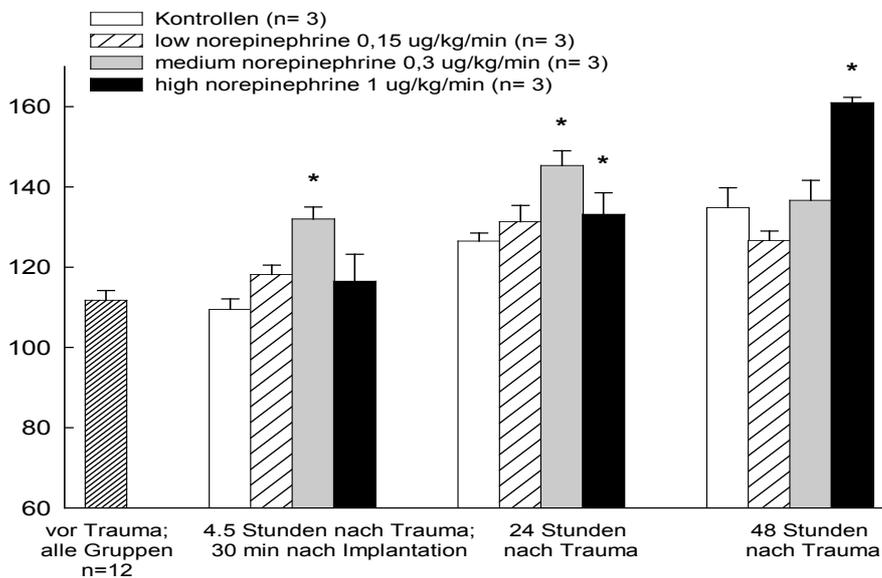


Abbildung 6: kontinuierliche hochdosierte Noradrenalininfusion (1 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$) führte 24 und 48 Stunden nach Trauma zu einer signifikanten Erhöhung des SABP. Noradrenalin in einer mittleren Dosis von 0,3 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ erhöhte den SABP 4,5 und 24 Stunden nach Trauma. * entspricht $p < 0,05$

4.1.3 Kontusionsvolumen

Das kortikale Kontusionsvolumen nach niedrigdosierter Noradrenalininfusion war mit $47,8 \pm 17,8 \text{ mm}^3$ signifikant vermindert im Vergleich zu Versuchstieren, die NaCl erhielten ($85,8 \pm 15,2 \text{ mm}^3$, $p < 0,02$). Das Kontusionsvolumen war nach Noradrenalininfusion in mittleren und hohen Dosen unverändert ($81,4 \pm 17,9 \text{ mm}^3$ bzw. $84,4 \pm 15,8 \text{ mm}^3$)

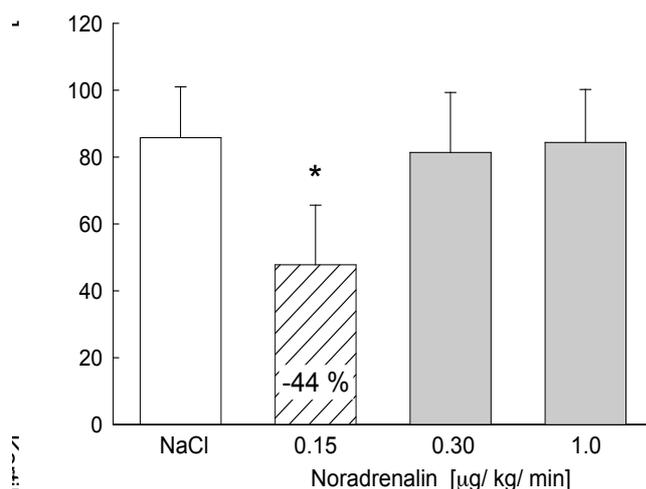
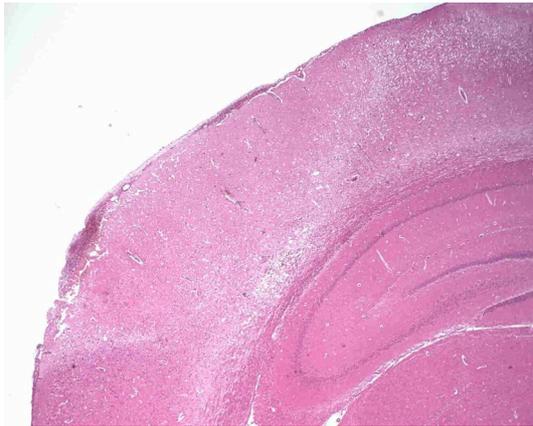
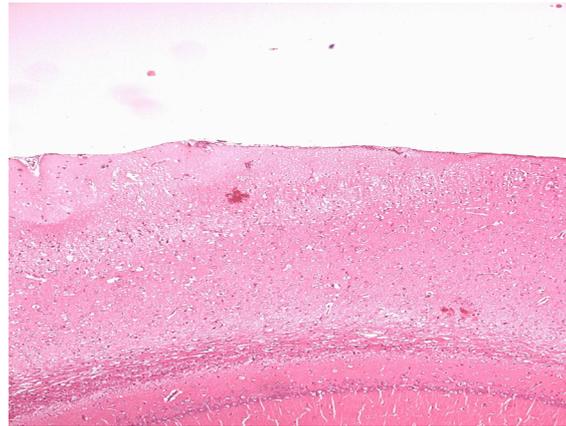


Abbildung 7: Einfluss von kontinuierlicher Noradrenalininfusion auf das kortikale Kontusionsvolumen nach CCII. Das Kontusionsvolumen ist nach Infusion niedrigdosierten Noradrenalins gegenüber der NaCl Kontrolle signifikant vermindert. Die Infusion höher dosierten Noradrenalins hatte keinen Effekt auf das Kontusionsvolumen. * entspricht $p < 0,05$

Beispielhaft zeigt die Abbildung 8 das Schädigungsmuster nach kortikaler Kontusion in 4 Versuchstieren Abhängigkeit von der Substanzgabe. Insbesondere unter den Versuchstieren, die Noradrenalin in mittlerer und hoher Dosierung erhielten, traten Hämmorrhagien im Bereich des Kontusionsherdes auf.



NaCl



Noradrenalin 0,15 µg/kg/min



Noradrenalin 0,3 µg/kg/min



Noradrenalin 1µg/kg/min

Abbildung 8: Konzentrationsabhängiger Effekt von intravenös appliziertem Noradrenalin 48 Stunden nach experimenteller Kontusion des linken somatosensorischen Kortex. Im Vergleich zur Kontrollgruppe war das Kontusionsvolumen in der niedrigdosierten Noradrenalin Gruppe signifikant erniedrigt, während es in der mittel- und hochdosierten Substanzgruppe unverändert blieb. Bemerkenswert sind auch die deutlichen intraparenchymalen Hämorrhagien, die vor allem in der mittleren und hochdosierten Substanzgruppe auftraten. Ausschnitte repräsentativer H&E gefärbter Hirnschnitte, -3,8 mm relativ zum Bregma.

4.1.4 Intraparenchymales Blutungsvolumen

Posttraumatisch kam es in den Hirnen aller untersuchten Versuchstiere zu verschiedenen Blutungen in das Hirngewebe. Diese befanden sich sowohl subdural, subarachnoidal, innerhalb der Kontusion und im angrenzenden periläsionalen Kortex, als auch in der darunterliegenden weißen Substanz. Die intraparenchymalen Blutungen waren in den Versuchstiergruppen mit mittlerer und hoher NoradrenalinKonzentration (0,3 bzw 1,0 µg/kg/min) um 157% und 142% signifikant erhöht im Vergleich zu traumatisierten Ratten, die NaCl erhielten ($58,6 \pm 14,2 \text{ mm}^3$ und $55,2 \pm 16,2 \text{ mm}^3$ vs. $22,8 \pm 5,8 \text{ mm}^3$, $p < 0,02$). Vermehrt traten die beobachteten Blutungen in der Nähe von Gefäßen auf.

Verglichen mit der Kontrollgruppe war das Blutungsvolumen in der Versuchstiergruppe, die Noradrenalin in niedriger Dosierung erhielt, nicht signifikant erhöht ($34,3 \pm 19,4 \text{ mm}^3$). Im ipsilateralen Hippokampus oder in der kontralateralen Hemisphäre traten keine Blutungen auf.

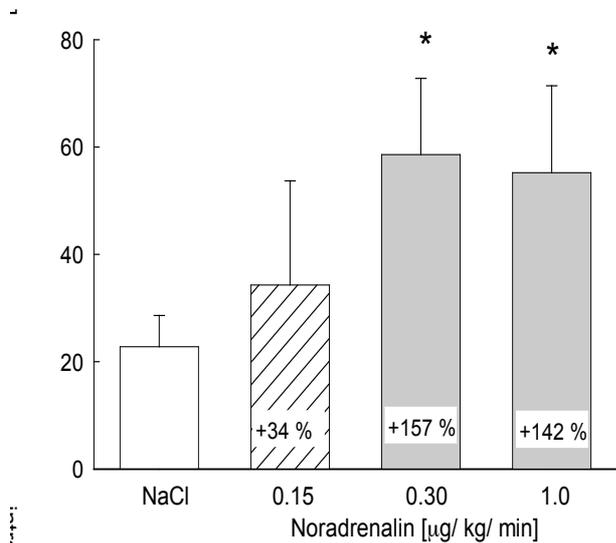
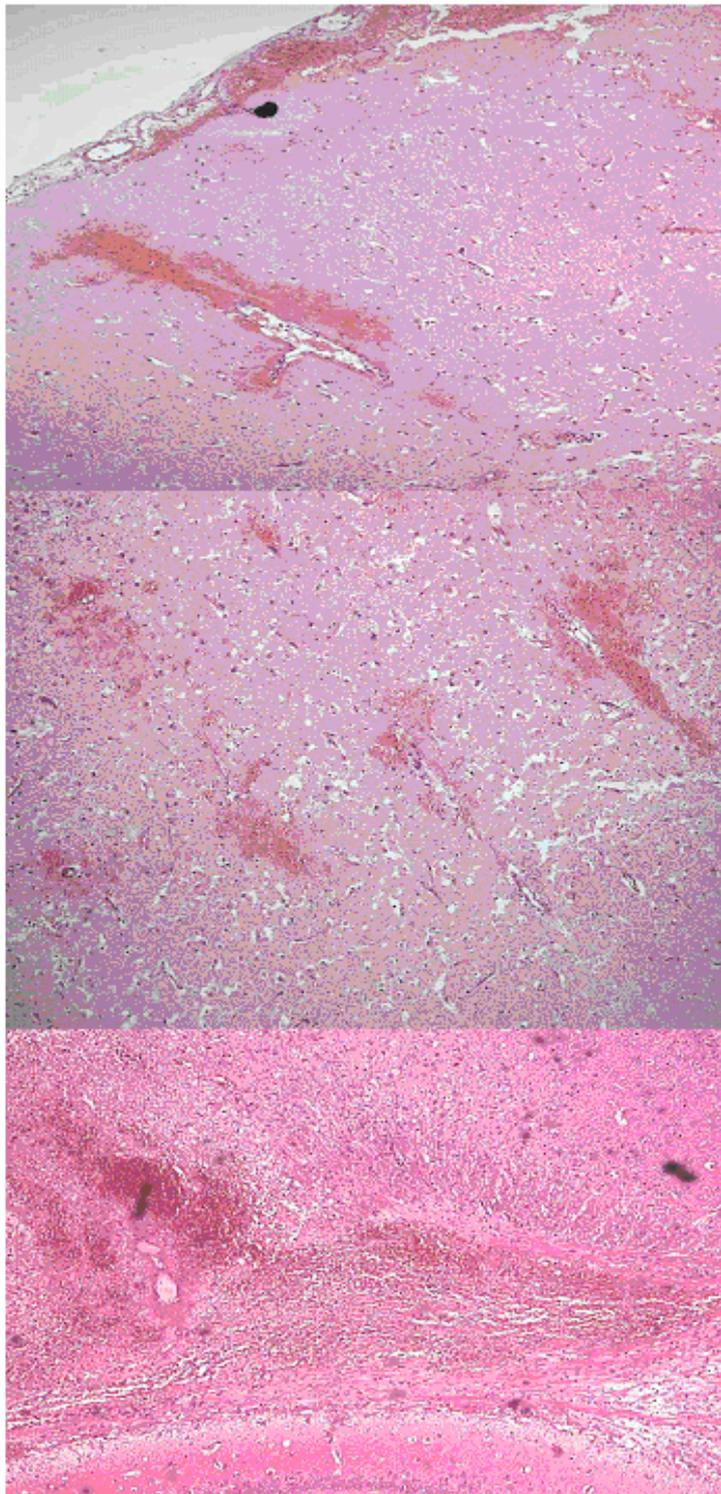


Abbildung 9: Die Infusion mittlerer und hoher Dosen Noradrenalin (0,3 bzw. 1,0 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$) erhöht signifikant das intraparenchymale Blutungsvolumen ($p < 0,05$). Das Blutungsvolumen nach niedrigdosierter Noradrenalininfusion ist im Vergleich zur NaCl Kontrollgruppe nicht signifikant erhöht.



Subarachnoidal,
oberflächlicher Cortex und
Cortex

tiefer Cortex

Weißer Substanz

Abbildung 10: Vergrößerungen aus repräsentativen H&E gefärbten Hirnschnitten zeigen intraparenchymale Blutungen. Das Volumen dieser Blutungen, die im Subarachnoidalraum, Cortex oder in der weißen Substanz gelegen sind, ist in Versuchstieren mit mittlerer und hoher Noradrenalin-Konzentration deutlich erhöht. Diese Blutungen werden häufig in der Nähe von Blutgefäßen beobachtet, was ein Hinweis auf eine gestörte Integrität der Blut-Hirn-Schranke sein kann.

4.2 Auswirkung einer kontinuierlichen niedrigdosierten Noradrenalininfusion

Im Folgenden werden die Auswirkungen von kontinuierlich appliziertem Noradrenalin in niedriger Dosierung (0,15 µg/kg/min) auf physiologische Parameter, Traumavolumen, Glutamattransporterexpression, sowie extrazelluläres Glutamat untersucht. Die Beobachtungszeiträume umfassen 48 Stunden, 7 Tage und 4 Wochen.

4.2.1 Physiologische Parameter

4.2.1.1 Gewicht

	vor Trauma	4 Stunden	24 Stunden	48 Stunden	7 Tage	4 Wochen
Gewicht in Gramm						
Trauma + Nor	316 ± 35	308 ± 32	299 ± 34	283 ± 43	272 ± 40	339 ± 72
Trauma + NaCl	317 ± 36	314 ± 35	300 ± 36	288 ± 40	271 ± 43	364 ± 32
kein Trauma Nor	318 ± 26	312 ± 29	301 ± 42	289 ± 16	279 ± 41	359 ± 26
kein Trauma NaCl	324 ± 20	319 ± 22	307 ± 21	290 ± 29	293 ± 36	370 ± 20
gesamt	318 ± 31	313 ± 30	302 ± 34	287 ± 34	277 ± 41	357 ± 45

Tabelle 2: Der Gewichtsverlauf in Gramm zu den einzelnen Untersuchungszeitpunkten nach Versuchsbeginn ist entsprechend der Versuchsgruppe dargestellt. Signifikante Gewichtsveränderungen im Vergleich zum Versuchsbeginn („vor Trauma“) sind fettgedruckt ($p < 0,05$). Traumaapplikation und Noradrenalingabe hatten keinen Einfluss auf das Gewicht im Vergleich zu Scheinoperation und NaCl Gabe. Zwischen 24 Stunden und 7 Tagen nach Versuchsbeginn kommt es zu einer signifikanten Gewichtsreduktion aller Versuchstiere („gesamt“). 4 Wochen nach Versuchsbeginn ist das mittlere Gewicht aller Versuchstiere („gesamt“) im Vergleich zum Versuchsbeginn erhöht.

Das mittlere Gewicht aller Versuchstiere vor Versuchsbeginn betrug $318 \pm 31,09$ Gramm. Die folgende Abbildung zeigt den Gewichtsverlauf aller Versuchstiere unabhängig von einer Traumatisierung oder Substanzgabe zu den einzelnen Überlebenszeiten. Die kontinuierliche Gewichtsabnahme zwischen 24 Stunden und 7 Tagen, sowie die Zunahme des mittleren Gewichts bis auf 112 Prozent des Ausgangsgewichtes nach 4 Wochen sind signifikant verglichen mit Werten vor dem Trauma. Es besteht kein signifikanter Unterschied zwischen traumatisierten und nicht traumatisierten Tieren bzw. zwischen Noradrenalin oder NaCl Infusion. Somit scheinen allein Narkose und Pumpenimplantation für die postoperative Gewichtsabnahme verantwortlich zu sein.

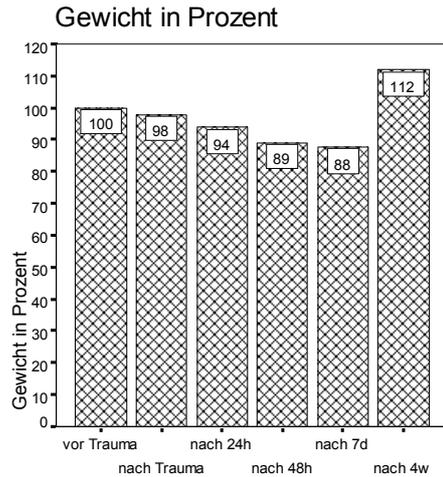


Abbildung 11: Gewicht in Prozent: Darstellung des Gewichts in Abhängigkeit von der Versuchsdauer. Es besteht ein signifikanter Unterschied nach 24 Stunden, 48 Stunden, 7 Tagen bzw. 4 Wochen nach Trauma im Vergleich zu Werten vor Versuchsbeginn. $p < 0,05$

4.2.1.2 Blutdruck – MABP

	vor Trauma	4 Stunden	24 Stunden	48 Stunden	7 Tage	4 Wochen
MABP in mmHg						
Trauma + Nor	102 ± 8	95 ± 11	100 ± 8	100 ± 9	96 ± 9	104 ± 6
Trauma + NaCl	101 ± 8	90 ± 10	95 ± 6	98 ± 3	99 ± 11	102 ± 13
kein Trauma Nor	97 ± 8	99 ± 8	97 ± 9	95 ± 5	104 ± 7	107 ± 9
kein Trauma NaCl	103 ± 9	96 ± 9	96 ± 7	95 ± 6	96 ± 10	100 ± 14
gesamt	101 ± 8	95 ± 10	97 ± 8	97 ± 6	99 ± 9	103 ± 11

Tabelle 3: Die Veränderungen des MABP sind entsprechend der Versuchsgruppe aufgeführt. Signifikante Werte sind fettgedruckt ($p < 0,05$). Im Vergleich zum Versuchsbeginn war der MABP aller Versuchstiere („gesamt“) 4 und 24 Stunden nach dem Trauma signifikant erniedrigt. Vor allem der MABP der traumatisierten Tiere („Trauma + Nor und Trauma + NaCl“) war nach 4 Stunden signifikant im Vergleich zum Versuchsbeginn („vor Trauma“) erniedrigt. 24 Stunden nach dem Trauma war der MABP in traumatisierten Tieren nach Noradrenalingabe signifikant höher, als nach NaCl Gabe (Trauma + Nor vs. Trauma + NaCl).

Die Abbildung 12 stellt den mittleren arteriellen Blutdruck (MABP) aller Versuchstiere während des Versuchsablaufes dar. Der MABP der Versuchstiere vor Versuchsbeginn betrug $100,9 \pm 8,1$ mmHg. Nach Traumaapplikation bzw. Scheinoperation war der MABP aller Versuchstiere („gesamt“) zu den Zeitpunkten 4 und 24 Stunden nach Trauma signifikant erniedrigt ($94,5 \pm 10$ mmHg bzw. $97,2 \pm 7,5$ mmHg, $p < 0,05$). Dieser Effekt beruht wahrscheinlich zu einem großen Teil auf der deutlichen Hypotension der traumatisierten Versuchstiere. Die traumatisierten Versuchstiere hatten 4 Stunden nach Versuchsbeginn mit $92,6 \pm 10,5$ mmHg einen signifikant erniedrigten MABP im Vergleich zu scheinoperierten Tieren ($97,4 \pm 8,8$ mmHg, $p < 0,05$). Die Gabe von Noradrenalin oder NaCl hatte zu diesem Zeitpunkt keinen Einfluss auf den MABP.

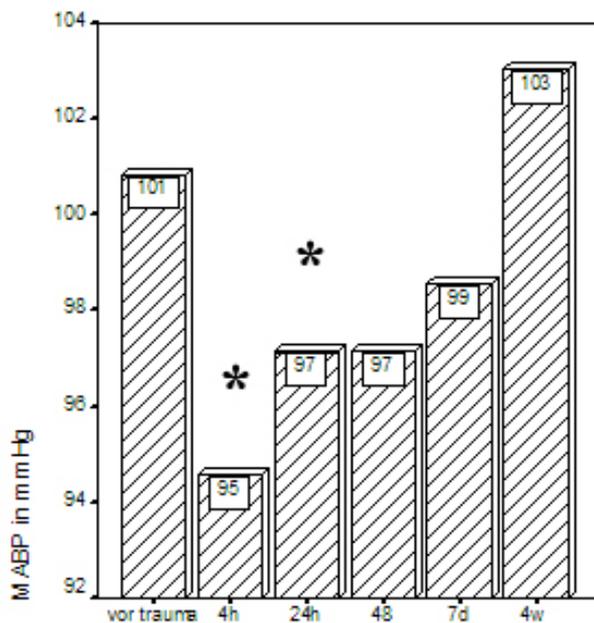


Abbildung 12: MABP aller Versuchstiere zu den verschiedenen Untersuchungszeitpunkten. Die postoperativen Veränderungen nach 4 und 24 Stunden sind signifikant ($p < 0,05$). Der Wert zum Zeitpunkt 48 Stunden erreicht aufgrund der kleineren Stichprobe keine statistische Signifikanz. Dargestellt sind zur besseren Anschaulichkeit nur die oberen Anteile der Balken.

Im Gegensatz zu den vorangestellten Ergebnissen im Vergleich verschiedener Noradrenalin-Konzentrationen zeigte sich jetzt eine signifikante MABP-Erhöhung nach Noradrenalininfusion nach 24 Stunden. Traumatisierte Versuchstiere hatten nach Noradrenalin-Gabe 24 Stunden nach Trauma einen signifikant erhöhten MABP verglichen mit traumatisierten Tieren, die NaCl erhalten hatten (Trauma + Nor: $100 \pm 8,2$ bzw. Trauma + NaCl: $95,3 \pm 5,7$ mmHg, $p < 0,05$) (Vgl. Tabelle 3). In den nichttraumatisierten Tieren hatte die Noradrenalin- oder NaCl-Gabe keinen Einfluss auf den MABP. Zu den übrigen Untersuchungszeitpunkten bestanden ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zwischen traumatisierten und nicht-traumatisierten Tieren bzw. zwischen solchen, die Noradrenalin oder NaCl erhalten haben.

4.2.1.3 Blutgase, Hb und Blutglucose

Tabelle 4 zeigt die Veränderungen von pH, $p\text{CO}_2$, $p\text{O}_2$, BE, SBC, BZ und Hb abhängig von der Versuchsgruppe über die gesamte Versuchszeit.

4 Stunden nach Versuchsbeginn ist der Serum-pH traumatisierter Tiere signifikant verringert im Vergleich zu nichttraumatisierten Versuchstieren ($7,44 \pm 0,04$ bzw. $7,46 \pm 0,03$ mmHg; $p < 0,05$). Ebenfalls 4 Stunden post Trauma ist der arterielle $p\text{CO}_2$ aller Versuchstiere mit $35,1 \pm 4,1$ mmHg signifikant erhöht gegenüber Werten vor dem Trauma bzw. 24 und 48 Stunden nach Trauma ($33,4 \pm 4,2$; $33 \pm 3,7$; $32 \pm 4,4$ mmHg; $p < 0,05$). Bezüglich des O_2 -Partialdruckes besteht kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen. Analog zu dem erniedrigten pH sind auch die base excess (BE)- und Standardbicarbonat (SBC) Werte in der posttraumatischen Frühphase nach 4 bzw. 48 Stunden signifikant erniedrigt im Vergleich zu Vor-Trauma Werten (BE: $0,7 \pm 1,2$ und $-0,1 \pm 1,4$ mmol/l vs. $1,5 \pm 1,6$ mmol/l; SBC: $24,9 \pm 2,1$ und $24,4 \pm 1,1$ vs. $25,8 \pm 1,4$ mmol/l; $p < 0,05$). Auch hier bestehen keine Unterschiede zwischen traumatisierten und scheinoperierten bzw. NaCl oder Noradrenalin behandelten Tieren. Die Blutglucosekonzentration war 24 Stunden nach Versuchsbeginn signifikant verringert ($147,3 \pm 40$ mg/dl vs. $169,4 \pm 43$ mg/dl; $p < 0,05$). Die Hb-Konzentration war in allen Tieren unabhängig von der Intervention 24 Stunden, 48 Stunden und 7 Tage nach Versuchsbeginn erniedrigt ($11,6 \pm 1,4$; $11,6 \pm 1,8$; $11,9 \pm 1,2$ mg/dl vs. $12,9 \pm 1,2$ mg/dl, $p < 0,05$).

	vor Trauma	4 Stunden	24 Stunden	48 Stunden	7 Tage	4 Wochen
pH						
Trauma + Nor	7,49 ± 0,04	7,43 ± 0,05	7,48 ± 0,03	7,47 ± 0,03	7,48 ± 0,03	7,46 ± 0,05
Trauma + NaCl	7,47 ± 0,03	7,44 ± 0,04	7,47 ± 0,04	7,45 ± 0,03	7,45 ± 0,05	7,47 ± 0,04
kein Trauma Nor	7,47 ± 0,04	7,45 ± 0,03	7,47 ± 0,04	7,46 ± 0,04	7,49 ± 0,03	7,48 ± 0,01
kein Trauma NaCl	7,48 ± 0,03	7,47 ± 0,03	7,50 ± 0,08	7,47 ± 0,02	7,47 ± 0,02	7,47 ± 0,04
gesamt	7,48 ± 0,04	7,45 ± 0,04	7,48 ± 0,05	7,46 ± 0,03	7,47 ± 0,03	7,47 ± 0,04
pCO₂ in mmHg						
Trauma + Nor	32 ± 5	36 ± 4	33 ± 3	31 ± 6	31 ± 7	35 ± 6
Trauma + NaCl	34 ± 4	35 ± 6	33 ± 4	33 ± 4	35 ± 5	35 ± 3
kein Trauma Nor	34 ± 4	35 ± 3	33 ± 5	33 ± 3	32 ± 2	33 ± 3
kein Trauma NaCl	33 ± 4	33 ± 3	33 ± 3	31 ± 3	33 ± 3	36 ± 4
gesamt	33 ± 4	35 ± 4	33 ± 4	32 ± 4	33 ± 5	35 ± 4
pO₂ in mmHg						
Trauma + Nor	119 ± 43	125 ± 31	111 ± 24	139 ± 46	117 ± 37	113 ± 39
Trauma + NaCl	127 ± 39	111 ± 22	128 ± 29	127 ± 36	136 ± 41	101 ± 33
kein Trauma Nor	101 ± 23	106 ± 12	106 ± 23	111 ± 7	115 ± 32	106 ± 35
kein Trauma NaCl	97 ± 22	108 ± 25	103 ± 20	102 ± 12	98 ± 9	132 ± 48
gesamt	113 ± 36	114 ± 26	114 ± 26	124 ± 35	118 ± 34	112 ± 39
BE in mmol/l						
Trauma + Nor	1,50 ± 1,90	0,38 ± 2,98	1,26 ± 1,93	0,73 ± 1,08	0,17 ± 3,60	1,30 ± 1,33
Trauma + NaCl	1,49 ± 1,74	0,72 ± 1,48	1,33 ± 1,80	1,11 ± 1,41	1,11 ± 1,98	1,78 ± 1,39
kein Trauma Nor	1,54 ± 1,02	0,60 ± 1,58	1,29 ± 2,43	0,15 ± 1,48	2,03 ± 1,66	1,83 ± 1,38
kein Trauma NaCl	1,65 ± 1,39	1,06 ± 1,19	2,05 ± 1,22	0,03 ± 0,72	0,45 ± 1,78	2,44 ± 1,50
gesamt	1,53 ± 1,59	0,66 ± 2,06	1,47 ± 1,86	0,14 ± 1,39	0,83 ± 2,43	1,82 ± 1,39
SBC in mmol/l						
Trauma + Nor	25,8 ± 1,7	24,4 ± 3,2	25,6 ± 1,5	24,6 ± 1,7	24,4 ± 3,0	25,6 ± 1,2
Trauma + NaCl	25,8 ± 1,5	25,1 ± 1,3	25,5 ± 1,6	24,0 ± 0,7	25,4 ± 1,8	26,0 ± 1,2
kein Trauma Nor	25,7 ± 1,0	25,0 ± 1,3	25,6 ± 2,0	24,5 ± 1,2	26,2 ± 1,5	26,0 ± 1,2
kein Trauma NaCl	25,8 ± 1,3	25,4 ± 1,0	26,3 ± 1,1	24,4 ± 0,6	24,9 ± 1,5	26,6 ± 1,3
gesamt	25,8 ± 1,4	24,9 ± 2,1	25,7 ± 1,6	24,4 ± 1,1	25,2 ± 2,1	26,0 ± 1,2
BZ in mg/dl						
Trauma + Nor	172 ± 42	178 ± 34	143 ± 22	160 ± 54	170 ± 41	157 ± 22
Trauma + NaCl	172 ± 44	168 ± 40	146 ± 45	117 ± 40	188 ± 66	194 ± 23
kein Trauma Nor	159 ± 46	165 ± 47	144 ± 43	150 ± 57	173 ± 36	163 ± 35
kein Trauma NaCl	174 ± 41	163 ± 48	155 ± 47	170 ± 56	174 ± 47	172 ± 40
gesamt	169 ± 43	169 ± 42	147 ± 40	151 ± 52	176 ± 46	173 ± 33
Hb in mg/dl						
Trauma + Nor	12,7 ± 1,6	13,0 ± 1,2	11,4 ± 1,7	11,2 ± 2,2	11,8 ± 1,9	12,5 ± 1,0
Trauma + NaCl	12,8 ± 1,2	12,6 ± 0,8	11,5 ± 1,4	11,9 ± 2,0	12,3 ± 0,9	12,7 ± 1,9
kein Trauma Nor	13,1 ± 0,9	13,3 ± 0,9	11,6 ± 1,5	11,7 ± 1,0	12,3 ± 0,8	13,5 ± 0,8
kein Trauma NaCl	12,9 ± 0,8	12,9 ± 0,8	12,0 ± 1,0	11,8 ± 1,0	11,4 ± 0,9	13,6 ± 0,6
gesamt	12,9 ± 1,2	12,9 ± 1,0	11,6 ± 1,4	11,6 ± 1,8	11,9 ± 1,2	13,0 ± 1,3

Tabelle 4: pH, pCO₂, PO₂, BE, SBC, BZ und Hb aus der Blutgasanalyse sind entsprechend der Versuchsgruppe aufgeführt. Signifikante Werte sind fettgedruckt (p<0,05). Zwischen den einzelnen Versuchsgruppen bestehen. Die Mittelwerte aller Versuchstiere (gesamt) weisen jedoch auf signifikante Hb Abfall, Hypoglykämie und azidotische Stoffwechsellage bis 7 Tage nach Versuchsbeginn hin.

4.2.2 Traumavolumen

Das mittlere kortikale Kontusionsvolumen von Ratten, die Noradrenalin erhielten, war 48 Stunden nach Controlled Cortical Impact Injury im Vergleich zu Versuchstieren, die

NaCl erhielten, signifikant vermindert ($51,6 \pm 19,8 \text{ mm}^3$ vs. $85,7 \pm 20,4 \text{ mm}^3$; $p < 0,001$). 7 Tage nach experimentellem Hirntrauma betrug das mittlere Traumavolumen in der nach Noradrenalininfusion $27,2 \pm 7,9 \text{ mm}^3$ und nach NaCl-Infusion $28,1 \pm 8,6 \text{ mm}^3$. Zu diesem Zeitpunkt, wie auch 4 Wochen nach Traumaapplikation ($12,9 \pm 3,4 \text{ mm}^3$ vs. $16,1 \pm 7,7 \text{ mm}^3$) gibt es keine signifikanten Unterschiede in der Traumagröße zwischen mit Noradrenalin oder NaCl behandelten Versuchstieren. Allerdings hat sich das Traumavolumen nach 7 Tagen sowie 4 Wochen nach Traumainduktion im Vergleich zur Gruppe der 48 Stunden NaCl-Tiere signifikant verringert ($p < 0,001$).

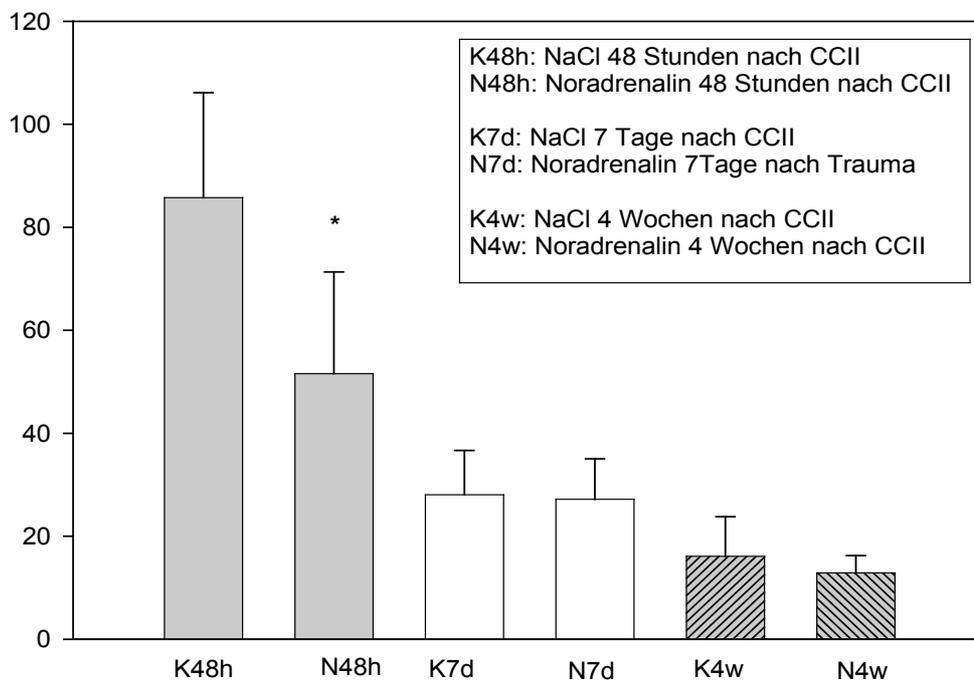


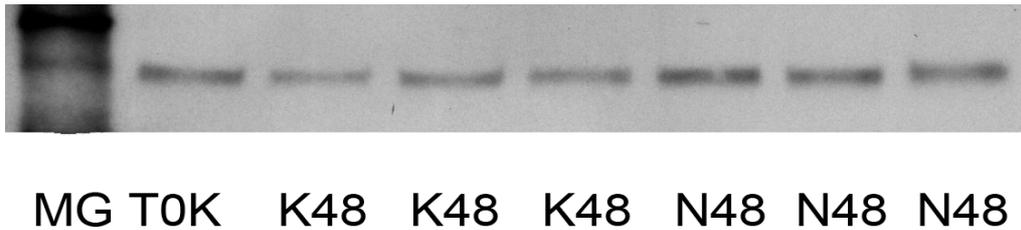
Abbildung 13: Das kortikale Kontusionsvolumen von mit Noradrenalin behandelten Tieren ist 48 Stunden nach Trauma im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erniedrigt. Das gemessene Traumavolumen nimmt mit zunehmender Versuchsdauer kontinuierlich ab und zeigt 7 Tage bzw. 4 Wochen nach Traumaapplikation keine signifikanten Unterschiede zwischen behandelten und nicht behandelten Versuchstieren.

4.2.3 Western Blot

Die semiquantitative Bestimmung der Glutamattransporterproteine erfolgte zu den Zeitpunkten 48 Stunden, 7 Tage sowie 4 Wochen postkontusionell. Die Western Blot Ana-

lyse ergab eine starke und stabile Expression von Glutamattransportern im untersuchten periläsionalen Hirngewebe. Die eingesetzten mono- und polyklonalen Antikörper gegen EAAT1 markierten eine Proteinbande bei 65 kDa. Der Glutamattransporter EAAT2 wurde durch die eingesetzten Antikörper wie erwartet bei einem Molekulargewicht von 73 kDa markiert. 48 Stunden nach dem Trauma zeigte sich im ipsilateralen Kortex eine Zunahme der Expression von EAAT1 nach Behandlung mit Noradrenalin um 9,99% ($p < 0,05$) im Vergleich zu traumatisierten Ratten, die NaCl erhielten. Die EAAT2 Expression war um 4,4% im Vergleich zu traumatisierten Kontrolltieren erhöht ($p < 0,05$). Auch im Vergleich zu nichttraumatisierten Kontrolltieren zeigte sich eine um 11,07% vermehrte EAAT1 Expression traumatisierter und mit Noradrenalin behandelter Versuchstiere ($p < 0,05$). Im Gegensatz dazu bestand zu diesem Untersuchungszeitpunkt kein Unterschied zwischen nichttraumatisierten Tieren und Versuchstieren, die nach dem Trauma NaCl erhielten.

48h EAAT1



48h EAAT2

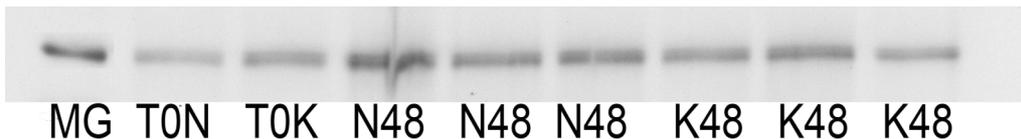


Abbildung 14: Western Blot Analyse der EAAT1 (oberer Blot) und EAAT2 (unterer Blot) Expression 48 Stunden nach Traumainduktion. Der Molekulargewichtsmarker (MG) markiert eine Antikörperbindung bei 66kDa (48h EAAT1) bzw. 73kDa (48h EAAT2). Die lanes sind wie folgt bezeichnet: T0K: nichttraumatisiertes Kontrolltier; K48: traumatisiertes Versuchstier nach NaCl Infusion, 48 Stunden post Trauma; N48: traumatisiertes und mit Noradrenalin behandeltes Versuchstier, 48 Stunden post Trauma. Die Expression von EAAT1 war um 9,99% gesteigert in der Gruppe der mit Noradrenalin behandelten Tiere. EAAT2 wurde in dieser Gruppe um 4,35 % vermehrt exprimiert ($p < 0,05$).

7 Tage nach dem Trauma zeigte sich weiterhin eine signifikante Zunahme der Expression von EAAT2 um 7,3 % nach posttraumatischer Noradrenalininfusion im Vergleich

zur traumatisierten Kontrollgruppe (siehe auch Abb. 11). EAAT1 hingegen ist zu diesem Zeitpunkt in beiden Versuchsgruppen gleich stark exprimiert.

4 Wochen postkontusionell gibt es keine erkennbaren Effekte durch die Noradrenalininfusion auf die Expression von EAAT1 und EAAT2 mehr. In der semiquantitativen Westernblotanalyse zeigen beide Versuchsgruppen ein ähnliches Expressionsverhalten der Glutamatransporter.

gesamt EAAT1



gesamt EAAT2

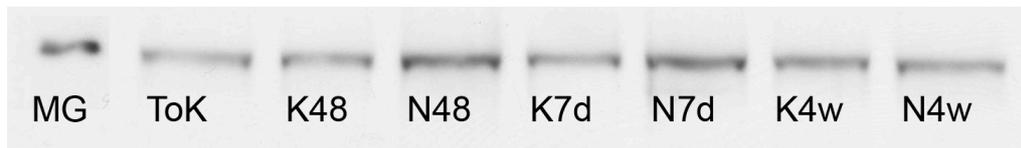


Abbildung 15: repräsentative Ausschnitte aus Western Blot Analysen von EAAT1 (oberer Blot) und EAAT2 (unterer Blot). Die lanes sind wie folgt bezeichnet: MG: Molekulargewichtsmarker; T0k: nichttraumatisiertes Kontrolltier; K48/K7d/K4w: traumatisierte Versuchstiere nach NaCl-Infusion, 48 Stunden, 7 Tagen und 4 Wochen post Trauma; N48/N7d/N4w: traumatisierte Versuchstiere nach Noradrenalin-Infusion, 48 Stunden, 7 Tagen und 4 Wochen post Trauma.

Weiterhin wurde das Expressionsverhalten in der Gruppe der nichttraumatisierten Versuchstiere untersucht. Auch in diesen Gruppen wurde EAAT1 und EAAT2 durch die verwendeten Antikörper bei 66kDa und 73kDa deutlich markiert. Hier zeigte sich im Gegensatz zu den traumatisierten Tieren zu keinem untersuchten Zeitpunkt eine Differenz in der Expression von EAAT1 und EAAT2, unabhängig von einer posttraumatischen Noradrenalin oder NaCl Infusion.

4.2.4 Mikrodialyse

Die Tabelle 4 zeigt die mittels Mikrodialyse im extrazellulären Raum gemessenen Konzentrationen von Glucose, Glutamat, Laktat, Pyruvat und Glycerol. Alle nicht traumatisierten Versuchstiere wurden unabhängig von den einzelnen Überlebenszeiten in einer Gruppe zusammengefasst („kein Trauma“). Die Zeitangaben 4h, 24h, 48h bezeichnen

jeweils die Zeit in Stunden nach dem Trauma. „Trauma Nor“ entspricht traumatisierten Tieren mit Noradrenalininfusion, „Trauma NaCl“ bezeichnet dementsprechend traumatisierte Tiere, die NaCl erhalten haben.

	kein Trauma	Trauma Nor 4h	Trauma NaCl 4h	Trauma Nor 24h	Trauma NaCl 24h	Trauma Nor 48h	Trauma NaCl 48h
	Mittelwert Stabw	Mittelwert Stabw	Mittelwert Stabw	Mittelwert Stabw	Mittelwert Stabw	Mittelwert Stabw	Mittelwert Stabw
Glucose in mmol/l	2,41 ± 0,70	2,13 ± 0,22	2,53 ± 0,73	2,33 ± 0,68	2,70 ± 0,63	* 3,79 ± 1,08	3,28 ± 1,73
Glutamat in µmol/l	16,76 ± 14,76	7,52 ± 6,62	16,95 ± 12,89	13,81 ± 5,05	* 41,1 ± 16,1	14,62 ± 6,60	24,08 ± 13,92
Laktat in mmol/l	1,19 ± 0,58	1,28 ± 0,15	1,58 ± 0,28	1,38 ± 0,47	1,63 ± 0,33	* 1,99 ± 0,64	* 3,29 ± 1,26
Pyruvat in µmol/l	62,81 ± 46,99	* 70,24 ± 18,56	34,90 ± 5,00	55,22 ± 31,32	45,03 ± 12,74	112,20 ± 60,56	114,02 ± 68,09
Glycerol in µmol/l	31,31 ± 29,22	34,03 ± 15,29	26,96 ± 14,84	8,70 ± 6,77	34,64 ± 28,37	38,20 ± 44,57	73,55 ± 41,99

Tabelle 5: Konzentrationen von Glucose, Glutamat, Laktat, Pyruvat und Glycerol im extrazellulären Raum ermittelt durch Mikro dialyse. Angaben als Mittelwerte ± Standardabweichung. Signifikante Werte sind fettgedruckt und mit * gekennzeichnet ($p < 0,05$).

4.2.4.1 Glucose

Die extrazelluläre Glucosekonzentration war in der Gruppe aller traumatisierten Versuchstiere nicht signifikant erhöht im Vergleich zu nichttraumatisierten Tieren ($2,9 \pm 1,1$ mmol/l vs. $2,41 \pm 0,70$). Die höchsten Glucosewerte traten in den traumatisierten Tieren 48 Stunden nach dem Trauma auf. Im Vergleich zu nichttraumatisierten Tieren war die extrazelluläre Glucosekonzentration zu diesem Zeitpunkt in Tieren, die mit Noradrenalin behandelt wurden signifikant erhöht ($3,79 \pm 1,08$ in mmol/l vs. $2,41 \pm 0,70$ in mmol/l, $p < 0,05$). Innerhalb der einzelnen Überlebenszeiten gibt es jedoch keinen signifikanten Unterschied zwischen der posttraumatischen Gabe von Noradrenalin oder NaCl.

Weder zu den einzelnen Überlebenszeitpunkten noch im Vergleich aller Überlebenszeiten der traumatisierten Versuchstiere hatte die Applikation von Noradrenalin oder NaCl einen Einfluß auf die Höhe der Glucosekonzentration.

Auch unter den nichttraumatisierten Tieren sind die Glucosekonzentrationen zu den untersuchten Zeitpunkten unabhängig von einer Substanzgabe (Daten nicht gezeigt).

4.2.4.2 Glutamat

Unabhängig von der Überlebenszeit sind die extrazellulären Glutamatkonzentrationen in traumatisierten Tieren, die mit NaCl behandelt wurden, signifikant höher, als in Versuchstieren nach Noradrenalingabe ($28,68 \pm 17,1 \mu\text{mol/l}$ vs. $12,07 \pm 6,8 \mu\text{mol/l}$). 24 Stunden nach kortikaler Kontusion kommt es in Tieren, die NaCl erhielten zu einem deutlichen Glutamatanstieg. Die extrazellulären Glutamatkonzentrationen sind im Vergleich zu Werten, die in nichttraumatisierten Tieren gemessen wurden, signifikant erhöht ($41,1 \pm 16,1 \mu\text{mol/l}$ vs. $16,76 \pm 14,76 \mu\text{mol/l}$, $p < 0,05$).

In den mit NaCl behandelten traumatisierten Versuchstieren kommt es 24 Stunden nach dem Trauma zu einem deutlichen Anstieg der Glutamatkonzentration. Diese Konzentrationserhöhung ist im Vergleich zu Noradrenalinintieren zum Zeitpunkt 24 Stunden ($41,1 \pm 16,1 \mu\text{mol/l}$ vs. $13,81 \pm 5,05 \mu\text{mol/l}$, $p < 0,05$), 4 Stunden und 48 Stunden ($41,1 \pm 16,1 \mu\text{mol/l}$ vs. $7,52 \pm 6,62 \mu\text{mol/l}$ bzw. $14,62 \pm 6,60 \mu\text{mol/l}$; $p < 0,05$) signifikant.

Innerhalb der Überlebenszeiten 4 Stunden und 48 Stunden besteht kein signifikanter Unterschied zwischen Tieren, die mit Noradrenalin oder NaCl behandelt wurden.

Unter den nichttraumatisierten Tieren traten weder zu den verschiedenen Überlebenszeiten, noch abhängig von der Substanzgabe signifikante Unterschiede auf (Daten nicht abgebildet).

4.2.4.3 Laktat/Pyruvat

Im Vergleich aller Versuchstiere unabhängig von der Substanzgabe war die Laktatkonzentration in traumatisierten Tieren signifikant gegenüber nichttraumatisierten Versuchstieren erhöht ($1,91 \pm 0,9 \text{ mmol/l}$ vs. $1,19 \pm 0,58 \text{ mmol/l}$, $p < 0,05$). Die durchschnittliche extrazelluläre Laktatkonzentration aller traumatisierten Tiere betrug nach Noradrenalininfusion $1,65 \pm 0,6 \text{ mmol/l}$ und war in traumatisierten Tieren, die NaCl erhielten mit $2,14 \pm 1,07 \text{ mmol/l}$ nicht signifikant erhöht.

Die signifikant höchsten Laktatkonzentrationen wurden 48 Stunden postkontusionell in Tieren, die NaCl erhielten, gemessen. In diesen Versuchstieren sind die Laktatwerte sowohl im Vergleich zu nichttraumatisierten Tieren ($3,29 \pm 1,26 \text{ mmol/l}$ vs. $1,19 \pm 0,58 \text{ mmol/l}$, $p < 0,05$) als auch verglichen mit noradrenalinbehandelten Tieren 48 Stunden nach dem Trauma ($3,29 \pm 1,26 \text{ mmol/l}$ vs. $1,99 \pm 0,64 \text{ mmol/l}$, $p < 0,05$) signifikant erhöht. Aber auch nach Noradrenalingabe kommt es 48 Stunden nach dem Trauma zu im Vergleich zu nichttraumatisierten Tieren signifikant erhöhten Laktatwerten ($1,99 \pm 0,64$

mmol/l vs. $1,19 \pm 0,58$, $p < 0,05$). Wie bereits erwähnt ist diese Erhöhung jedoch deutlich schwächer ausgeprägt als in NaCl behandelten Tieren.

4 und 24 Stunden nach dem Trauma sind die Laktatkonzentrationen weder signifikant erhöht im Vergleich zu nichttraumatisierten Tieren, noch kommt es zu signifikanten Unterschieden zwischen Tieren, die mit Noradrenalin oder NaCl behandelt wurden.

Zwischen den nichttraumatisierten Tieren traten weder zu den verschiedenen Untersuchungszeitpunkten, noch abhängig von der Substanzgabe signifikante Unterschiede in den gemessenen Laktatkonzentrationen auf (Daten nicht abgebildet).

4 Stunden nach dem Trauma sind die Pyruvatkonzentrationen in mit Noradrenalin behandelten Tieren gegenüber NaCl Tieren signifikant erhöht ($70,24 \pm 18,56$ $\mu\text{mol/l}$ vs. $34,90 \pm 5,00$ $\mu\text{mol/l}$, $p < 0,05$). Weitere signifikante Unterschiede vor allem in Bezug auf nichttraumatisierte Versuchstiere oder innerhalb der einzelnen Überlebenszeiten zwischen traumatisierten Noradrenalin- und NaCl-Tieren betanden nicht.

Auch zwischen den nichttraumatisierten Tieren traten bezüglich der Pyruvatkonzentration weder zu den verschiedenen Untersuchungszeitpunkten, noch abhängig von der Substanzgabe signifikante Unterschiede auf (Daten nicht abgebildet).

4.2.4.4 Glycerol

Bezüglich der Glycerolwerte konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen traumatisierten und nichttraumatisierten Versuchstieren ermittelt werden. In der Auswertung der einzelnen Überlebenszeitpunkte gab es abhängig von der Behandlung der Versuchstiere mit Noradrenalin oder NaCl ebenfalls keine signifikanten Unterschiede.

Die Abbildung 16 zeigt einen Trend traumatisierter Versuchstiere nach Noradrenalingabe zu niedrigeren Glycerolwerten im Vergleich zu traumatisierten NaCl-Tieren. Die gezeigten Unterschiede sind jedoch wahrscheinlich aufgrund der hohen Standardabweichung statistisch nicht signifikant.

Auch unter den nichttraumatisierten Tieren traten weder zu den verschiedenen Untersuchungszeitpunkten, noch abhängig von der Substanzgabe signifikante Unterschiede in der Glycerolkonzentration auf (Daten nicht abgebildet).

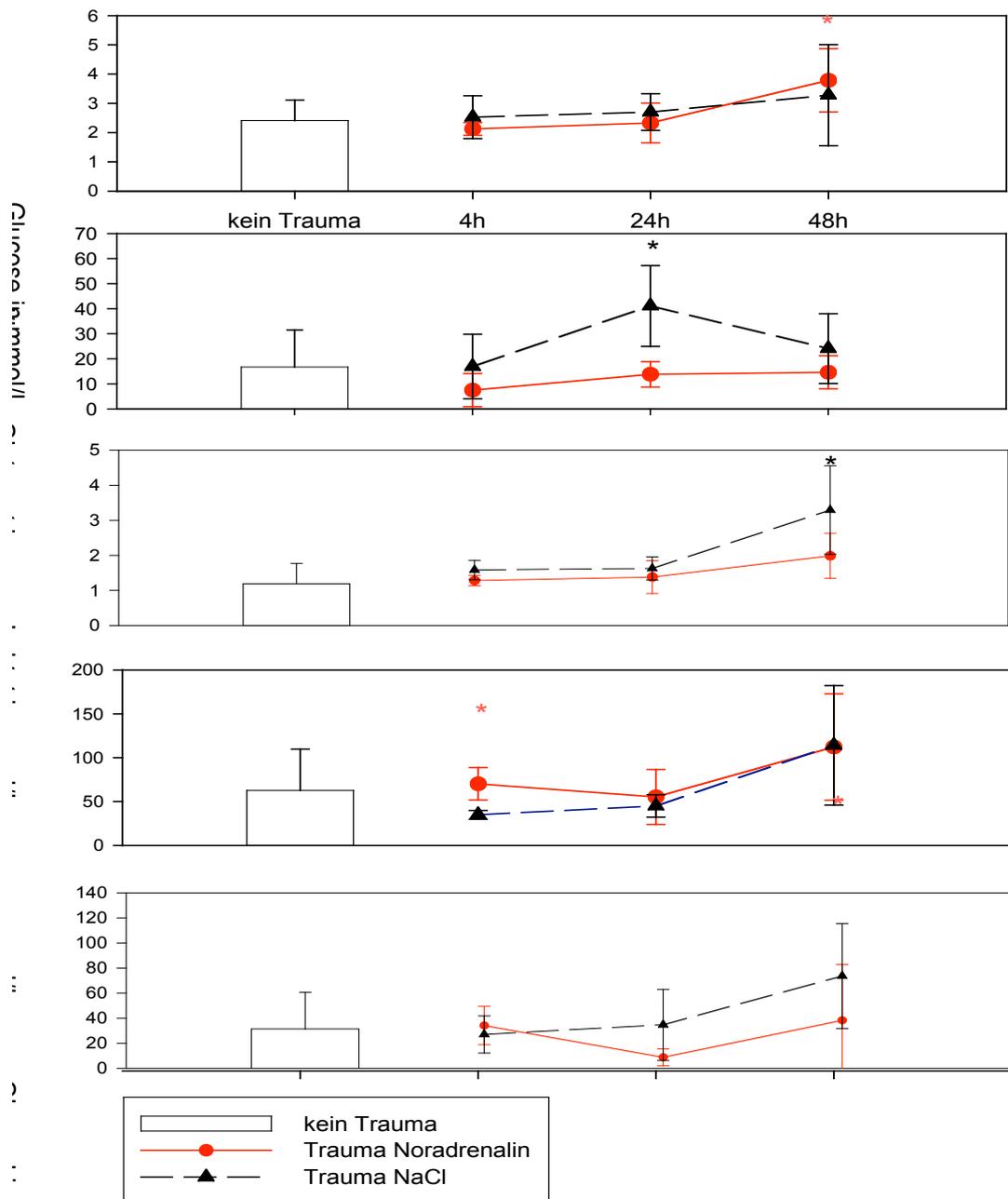


Abbildung 16: periläsionale extrazelluläre Konzentrationen von Glucose, Glutamat, Laktat, Pyruvat und Glycerol. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen. Signifikante Veränderungen sind mit *-(NaCl behandelte Versuchstiere) oder *-(Noradrenalin behandelte Versuchstiere) gekennzeichnet ($p < 0,05$). Deutlich ist der posttraumatische Glutamatanstieg 24 Stunden nach Trauma in der NaCl-Gruppe. Im Gegensatz dazu war der Anstieg nach Noradrenalin-gabe deutlich geringer und nicht signifikant im Vergleich zu nicht traumatisierten Tieren. Die signifikant höchsten Laktatwerte aller Versuchsgruppen traten ebenfalls bei NaCl behandelten Tieren 48 Stunden nach dem Trauma auf. Auch in der Noradrenalinbehandelten Gruppe war die Laktatkonzentration im Vergleich zu nichttraumatisierten Tieren zu diesem Zeitpunkt erhöht. Die Erhöhung sowohl der Noradrenalin als auch NaCl behandelten Tiere 48 Stunden nach dem Trauma ist nicht signifikant. Der Trend zu einem Anstieg der Glycerolwerte ist ebenfalls nicht signifikant.

5 Diskussion

Die dargestellten Ergebnisse zeigen, dass die kontinuierliche Infusion von niedrig konzentriertem Noradrenalin im hier vorgestellten Versuchsablauf neuroprotektiv nach experimenteller kortikaler Kontusion wirkte.

5.1 Arterieller Blutdruck

Noradrenalin führt durch die Stimulation adrenerger vaskulärer und myokardialer α - und β - Rezeptoren einerseits zu einer erhöhten myokardialen Kontraktilität, andererseits zu einer Kontraktion arterieller Widerstandsgefäße. Beide Mechanismen führen zu einer Steigerung des systolischen und diastolischen arteriellen Blutdruckes und damit zu einem Anstieg des MABP. In den hier vorliegenden Versuchen führte auch die Infusion mittlerer und hoher Dosen Noradrenalin (0,3 bzw. 1 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$) zunächst zu keinem untersuchten Zeitpunkt zu einer signifikanten Erhöhung des MABP. Allerdings kam es bei Tieren, die eine mittlere oder hohe Noradrenalinosis erhielten zu einer Erhöhung des nicht invasiv gemessenen SABP auf Maximalwerte von 146 bzw. 160 mmHg (van Landeghem et al., 2003). Im Gegensatz dazu konnte in früheren Studien, nach posttraumatischer kontinuierlicher Noradrenalininfusion (1,4 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$) über 90 Minuten beginnend 4 Stunden nach dem Trauma ein signifikanter Anstieg des systolischen und diastolischen Blutdruckes, und damit des MABP erzielt werden (Kroppenstedt et al., 2003; ; Stover et al., 2002). Auch in den hier vorliegenden Versuchen zeigte die Auswertung einer größeren Anzahl von Versuchstieren signifikante Unterschiede. So hatten traumatisierte Versuchstiere auch nach niedrigdosierter Noradrenalingabe 24 Stunden nach dem Trauma einen signifikant erhöhten MABP verglichen mit traumatisierten Tieren, die NaCl erhalten hatten ($100 \pm 8,2$ bzw. $95,3 \pm 5,7$ mmHg). Dieses Ergebnis bestätigt teilweise die Beobachtungen früherer Studien (Kroppenstedt et al., 2003; ; Stover et al., 2002), obwohl dieser Effekt zu den anderen Untersuchungszeitpunkten (4 Stunden, 48 Stunden, 7Tage und 4 Wochen nicht beobachtet wurde.

Die kortikale Kontusion führte nach 4 Stunden zu einem signifikanten Blutdruckabfall verglichen mit nichttraumatisierten Tieren ($92,6 \pm 10,5$ mmHg vs. $97,4 \pm 8,8$ mmHg, $p < 0,05$). Die Infusion von Noradrenalin oder NaCl hatte zu diesem Zeitpunkt keinen Einfluss auf den MABP. Werte von unter 70 mmHg, welche in früheren Studien zu einer

zusätzlichen Vergrößerung des Sekundärschadens führten, wurden jedoch nicht erreicht (Kroppenstedt et al., 1999). Insgesamt zeigte sich in allen Versuchstieren ein signifikanter Blutdruckabfall nach 4 bzw. 24 Stunden im Vergleich zu Werten vor Versuchsbeginn, was am ehesten als pathophysiologische Reaktion auf Narkose, Operation und vor allem kortikale Traumatisierung verstanden werden kann.

Die Methode der invasiven Blutdruckmessung mittels Punktion der Arteria femoralis, die unter Isofluran Narkose durchgeführt wurde, könnte auch für das Fehlen einer konstanten Blutdruckerhöhung nach Noradrenalingabe verantwortlich sein. Dabei könnte während der Messung durch den vasodilatierenden Effekt des Isoflurans ein noradrenalininduzierter Anstieg des MABP maskiert worden sein. Darauf deuten auch die Ergebnisse der nichtinvasiven Blutdruckmessung an wachen Ratten hin, in denen im Gegensatz zum MABP signifikant erhöhte SABP Werte nach mittel- und hochdosierter Noradrenalingabe ermittelt wurden. Weiterhin können mögliche Blutdruckveränderungen außerhalb der definierten Messpunkte in dem vorliegenden Studiendesign nicht erfasst werden. Um den möglichen Isofluraneffekt zu minimieren, wurde zu allen untersuchten Zeitpunkten eine Erhaltungsdosis von 1,5 Vol% benutzt.

Im Gegensatz zu den zitierten Studien (Kroppenstedt et al., 2003; ; Stover et al., 2002), in denen mithilfe adjustierbarer Infusionspumpen Noradrenalin in Konzentrationen von 1-2 µg/kg/min verabreicht wurde, um den MABP auf ein gewünschtes Niveau anzuheben, war in den vorliegenden Versuchen eine Anpassung der Infusionsraten der osmotischen Pumpen nicht möglich. Außerdem überschreiten die hier untersuchten Zeiträume (4,5 Stunden, 24 Stunden, 48 Stunden, 7 Tage) den Beobachtungshorizont der genannten Studien. Vor allem außerhalb der Akutphase könnten autoregulatorische Prozesse wie eine Downregulation der Rezeptoren zu einer verminderten Katecholaminempfindlichkeit beitragen. So konnte gezeigt werden, dass eine traumatische Hirnschädigung, insbesondere kombiniert mit einer Hypoxie, mit einer Verminderung der α -adrenergen Rezeptorempfindlichkeit einhergeht (Holtzer et al., 2001). Im Rahmen einer posttraumatischen Schädigung scheint es zu einer Aktivierung der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenachse zu kommen, die zu einer kontinuierlichen Freisetzung endogener Katecholamine führt (Hamill et al., 1987). Eine hierdurch induzierte Downregulation und Rezeptordesensitivierung (Hu et al., 1992) könnte durch die zusätzliche externe Katecholaminzufuhr im vorliegenden Studiendesign verstärkt werden. Auch Kroppenstedt et al. beschrieben, dass zum Erreichen eines MABP von 120 mmHg 24

Stunden nach dem Trauma signifikant höhere NoradrenalinKonzentrationen nötig waren, verglichen mit 4 Stunden (Kroppenstedt et al., 2003).

Eine abnehmende Katecholaminempfindlichkeit kombiniert mit einer stabilen Infusionsrate würde zu einer Abnahme des blutdruckerhöhenden Effektes führen. Damit im Einklang steht die bereits beschriebene MABP-Differenz nach 24 Stunden zugunsten Noradrenalin behandelter traumatisierter Tiere, welche 48 Stunden und 7 Tage nach dem Trauma trotz kontinuierlicher Infusion nicht mehr beobachtet wurde. Das es auch 4,5 Stunden nach dem Trauma zu keiner signifikanten MABP Erhöhung in traumatisierten, noradrenalinbehandelten Tieren gekommen ist, könnte auf einen Überlagerungseffekt durch die postoperative Hypotension zurückzuführen sein, die alle Versuchstiere, vor allem aber die Traumatisierten, zeigten. 4 Wochen nach dem Trauma sind keine akuten Effekte der Behandlung hinsichtlich des Blutdruckes zu erwarten, da die kontinuierliche Infusion bereits nach 7 Tagen beendet war, und die osmotischen Pumpen bereits entfernt worden sind.

Aufgrund technischer Spezifitäten erlauben die verwendeten osmotischen Pumpen, nachdem sie befüllt und implantiert sind, keine Änderung der infundierten Noradrenalin-Konzentrationen, sodass eine dynamische Kreislaufregulation hiermit nicht erreicht werden kann. Eine Erhöhung der initialen Konzentration jedoch hätte MABP Erhöhungen von über 140 mmHg induzieren können, von denen ein sekundärschadensteigernder Effekt bereits beschrieben wurde (Kroppenstedt et al., 1999).

Grundsätzlich kann eine gestörte Freisetzung des Noradrenalins aus den osmotischen Pumpen nicht ausgeschlossen werden, da weder im Serum noch in der verbleibenden Lösung die Konzentration von Noradrenalin oder seiner Metabolite gemessen worden ist. Allerdings sprechen die Beobachtungen sowohl MABP und SABP betreffend, als auch die Effekte hinsichtlich des intraparenchymalen Blutungsvolumens für eine kontinuierliche Freisetzung.

5.2 Kontusionsvolumen

5.2.1 Akutversuche, Vergleich verschiedener NoradrenalinKonzentrationen

Der erste Versuchsabschnitt (Akutversuche) hatte vor allem zum Ziel, die optimale Konzentration von Noradrenalin zur kontinuierlichen Infusion zu ermitteln. Weiterhin standen die Auswirkungen auf das kontusionierte Areal sowie auf physiologische Basispa-

parameter der Versuchstiere im Vordergrund der Untersuchungen. Hier zeigte sich, dass Noradrenalin in einer Dosis von 0,3 und 1,0 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ zu einer signifikanten Anhebung des SABP führt. Parallel dazu wurde in den Versuchstieren, die posttraumatisch Noradrenalin in diesen Konzentrationen erhielten, eine signifikante Zunahme des Volumens der intraparenchymalen Blutung gesehen. In diesen Tieren kam es auch zu keiner Reduktion des kortikalen Traumavolumens. In einer früheren Studie konnte gezeigt werden, dass die Anhebung des MABP auf mehr als 140 mmHg für 3 Stunden in der posttraumatischen Akutphase zu einer Vergrößerung des Kontusionsvolumens 24 Stunden nach dem Trauma führte (Kroppenstedt et al., 1999). Auch die Ergebnisse der hier vorliegenden Studie deuten auf einen unvoreilhaften Effekt einer kontinuierlichen posttraumatischen Noradrenalininfusion in Dosen von 0,3 und 1 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ hin. Noradrenalin in einer Dosis von 0,15 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ veränderte dagegen während der Akutversuche weder MABP noch SABP und führte zu einer signifikanten Reduktion des Kontusionsvolumens um 44%. Das intraparenchymale Blutungsvolumen blieb unverändert im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die posttraumatische kontinuierliche Infusion von niedrigdosiertem Noradrenalin führte ohne Beeinflussung des Blutdruckes zu einer Protektion des Hirngewebes. Ob die Noradrenalininfusion einen schädigenden oder neuroprotektiven Effekt hat, scheint demnach vor allem konzentrationsabhängig zu sein. Die Beeinflussung des MABP könnte hierfür ein prognostischer Parameter sein, da die negativen Auswirkungen bisher nur nach relevanten Blutdruckerhöhungen gezeigt werden konnten. Ab einer kritischen Konzentration könnten die positiven Effekte des Noradrenalins wie ein Anstieg der kortikalen Perfusion (Kroppenstedt et al., 2002) und eine Verbesserung der Gewebeoxygenierung (Kroppenstedt et al., 2003) in den Hintergrund treten. Die zeitgleich auftretenden schädigenden Wirkungen wie eine Steigerung der neuronalen Aktivität und Erhöhung der extrazellulären Glutamatkonzentration (Kroppenstedt et al., 2002) oder eine Zunahme der intraparenchymalen Blutung (vorliegende Studie) würden dann die neuroprotektiven Eigenschaften überlagern.

Allerdings können auch blutdruckunabhängige lokale Mechanismen für die Zunahme des intraparenchymalen Blutungsvolumens und die Vergrößerung des Sekundärschadens verantwortlich sein. So fungiert Noradrenalin neben seiner systemischen Wirkung auf α - und β - Rezeptoren auch als exzitatorischer Neurotransmitter im zentralen Nervensystem. Hier beeinflusst Noradrenalin dosis- und rezeptorabhängig die neuronale Erregbarkeit (Hasselmo et al., 1997), den glialen Glutamattransport (Fahrig, 1993) und den zerebralen Stoffwechsel (Fillenz et al., 1999; ; Pellerin et al., 1997). Auch die zereb-

rale Perfusion und die Integrität der Blut-Hirn-Schranke werden von Noradrenalin beeinflusst (Borges et al., 1994; MacKenzie et al., 1976). Weiterhin inaktiviert Noradrenalin freie Radikale und reduziert oxidativen Stress (Noh et al., 1999; Troadec et al., 2001). Dadurch wird die Inaktivierung von NO durch freie Radikale verhindert und eine lokale Vasodilatation begünstigt (Kontos und Wei, 1986).

Ebenso ist es denkbar, dass durch die exogene Zufuhr von Noradrenalin der posttraumatisch gestörte Noradrenalinstoffwechsel, der zu einer Verminderung des Noradrenalin gehaltes der betroffenen Hirnregion führt, zumindest teilweise verbessert werden kann (Prasad et al., 1994).

In früheren Studien ist bereits gezeigt worden, dass Noradrenalin durch die Stimulation α_1 -adrenerger Rezeptoren neuroprotektive Eigenschaften entfaltet. So reduziert es während der ersten 24 Stunden nach einem Schädel-Hirn-Trauma über eine Stabilisierung der Blut-Hirn-Schranke die Ödembildung (Dunn-Meynell et al., 1998). Auch verbessert Noradrenalin die posttraumatisch verminderte Glucoseutilisation des Hirngewebes (Queen et al., 1997) und bewirkt eine schnellere Rückbildung neurologischer Defizite sowie eine Verhaltensverbesserung (Dunn-Meynell et al., 1997; Feeney und Westerberg, 1990; Stibick und Feeney, 2001). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass es nach experimenteller traumatischer Hirnschädigung zu einer Verminderung der kortikalen α_1 -adrenergen Rezeptoren kommt, was zu einer verminderten Noradrenalinwirkung beitragen kann (Prasad et al., 1992). Durch eine gezielte pharmakologische Inhibition α_1 -adrenerger Rezeptoren kommt es zu einer anhaltenden Ödembildung. Neurologische Defizite werden gesteigert oder treten verzögert erneut auf (Dunn-Meynell et al., 1997; Stibick und Feeney, 2001).

Endogen ausgeschüttetes oder exogen appliziertes Noradrenalin kann unter physiologischen Bedingungen die intakte Blut-Hirn-Schranke nicht passieren. Schwere Schädel-Hirn Verletzungen können jedoch zu einer erhöhten Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke führen, sodass systemisch zirkulierendes Noradrenalin in das Hirngewebe übertreten kann (Edvinsson et al., 1978; Hardebo et al., 1977; Hardebo et al., 1977). Hierdurch kann der zerebrale Blutfluss und Sauerstoffverbrauch, sowie die zerebrale Glucoseaufnahme durch Aktivierung von β -Rezeptoren gesteigert werden (MacKenzie et al., 1976; MacKenzie et al., 1976). Die Aktivierung der G-Protein gekoppelten Katecholaminrezeptoren verstärkt die endotheliale NO Synthese (Tuttle und Falcone, 2001).

Hierdurch wird einerseits die lokale Vasodilatation vermittelt, andererseits kann in Verbindung mit Superoxiden zellschädigendes Peroxynitrit entstehen (Ohkuma und Katsura, 2001). Nach traumatischer Zerstörung der Blut-Hirn-Schranke und Übertritt von Noradrenalin in das Hirngewebe mit nachfolgender NO vermittelter Vasodilatation und Produktion freier Radikale kann es in den hier vorliegenden Versuchen zu einer progredienten Schädigung der Blut-Hirn-Schranke gekommen sein. Dies könnte die Vergrößerung des intraparenchymalen Blutungsvolumens nach kontinuierlicher Noradrenalininfusion in mittlerer und hoher Dosierung mitverursacht haben.

Ein neuroprotektiver Effekt der Noradrenalingabe im Sinne einer Reduktion des kortikalen Kontusionsvolumens wurde nur nach Infusion in niedriger Dosierung (0,15 µg/kg/min) beobachtet. In dieser Konzentration scheinen die gewebsschutzenden gegenüber den destruktiven Eigenschaften zu überwiegen, sodass die verminderte neuronale Erregbarkeit (Bergles et al., 1996; ; Hasselmo et al., 1997) durch die noradrenalininduzierte Aktivierung GABAerger Neurone, die β -Rezeptor vermittelte Stabilisierung der Blut-Hirn-Schranke (Borges et al., 1994), die erhöhte Aufnahme von Glutamat und Glutamin (Fahrig, 1993; ; Huang und Hertz, 1995) sowie die Inaktivierung freier Radikale (Noh et al., 1999; ; Troadec et al., 2001) zu einer signifikanten Reduktion des kortikalen Kontusionsvolumens ohne Vergrößerung des intraparenchymalen Blutungsvolumens führte.

Für die weiteren Versuche wurde daher diese Konzentration gewählt, um die vermuteten blutdruckunabhängigen Wirkungen des Noradrenalins auf die Glutamathomöostase als mögliche Ursache für die neuroprotektive Wirkung zu analysieren.

5.2.2 Auswirkungen einer kontinuierlichen niedrigdosierten Noradrenalininfusion

Entsprechend den Ergebnissen der Akutversuche zeigte sich auch in den Langzeitversuchen eine signifikante Reduktion des Kontusionsvolumens nach 48 Stunden Überlebenszeit in Tieren, die mit Noradrenalin behandelt wurden. Dieser neuroprotektive Effekt war allerdings nach den längeren Überlebenszeiten (7 Tage und 4 Wochen) nicht mehr messbar.

Für dieses Verhalten könnten verschiedene Mechanismen eine Rolle spielen. Unter der Annahme, dass der Effekt des Noradrenalins zeitlich begrenzt ist und sich hauptsächlich auf die Dauer der Anwendung beschränkt, könnte auch hier eine abnehmende Ka-

techolaminsensitivität in der posttraumatischen Spätphase für die fehlende Neuroprotektion verantwortlich sein. Einen Hinweis auf diesen Mechanismus liefern die Veränderungen des MABP, der lediglich 24 Stunden nach Trauma in traumatisierten Noradrenalin-Tieren signifikant erhöht ist im Vergleich zu traumatisierten NaCl-Tieren. Die abnehmende Wirkung des Noradrenalins könnte zur Folge haben, dass zwar noch 48 Stunden nach Trauma ein hirngewebsspezifischer Effekt nachweisbar ist, zu späteren Untersuchungszeitpunkten jedoch würde die zytotoxische Kaskade im Rahmen der sekundären Hirnschädigung den neuroprotektiven Effekt überlagern. Eine Downregulation von α_1 -Katecholaminrezeptoren würde einerseits den neuroprotektiven Effekt des Noradrenalins, der auf einer Erhöhung des CPP und rCBF basiert, vermindern (Kroppenstedt et al., 2002). Andererseits wäre auch die α_1 -Rezeptor vermittelte dosis- und zeitabhängige Steigerung der Glutamataufnahme herabgesetzt (Fahrig, 1993).

5.3 Glutamattransporterinduktion

In der Western Blot Analyse zeigt sich posttraumatisch eine relative Zunahme von Glutamattransporterproteinen in Versuchstieren, die Noradrenalin erhielten, im Gegensatz zu Tieren, die NaCl erhielten. Damit scheinen sich die Beobachtungen an Astrozytenkulturen zu bestätigen, in denen nach Noradrenalingabe eine Induktion der Glutamattransporter beschrieben wurde (Gegelashvili und Schousboe, 1997; ; Hansson und Ronnback, 1991). Ähnlich wie die blutdrucksteigernden Effekte könnte, wie von Fahrig et al. beschrieben, die induzierende Noradrenalinwirkung auf die Glutamattransporterexpression über α_1 -Rezeptoren vermittelt werden. So fanden Hansson und Rönback 1992 eine α_1 -Rezeptor vermittelte Induktion der glialen Glutamataufnahme. Die Aktivierung von α^1 -Rezeptoren könnte über eine Erhöhung des intrazellulären cAMP- Spiegels die Steigerung der Transporterexpression vermittelt haben. Es konnte gezeigt werden, dass Noradrenalin über die Aktivierung von α^1 -Katecholaminrezeptoren die intrazellulären cAMP Spiegel erhöht (Mori et al., 2002). Eine Erhöhung von cAMP in Astrozytenkulturen führte wiederum 24 Stunden nach der Gabe zu einem Anstieg der EAAT2 mRNA Expression mit einem Maximum nach 48 Stunden unter Einbeziehung des Proteinkinase A Signalweges (Su et al., 2003). Die intrazellulären Signal- und Proteinsynthesekaskaden sind jedoch nicht Gegenstand der vorliegenden Untersuchung gewesen. Auffällig ist, dass 48 Stunden nach dem Trauma EAAT1 Transporter relativ stärker induziert werden als EAAT2 Transporterproteine. Allerdings scheint das Ausmaß der In-

duktion mit einer Differenz zu NaCl behandelten Versuchstieren von 9,99% (EAAT1) bzw. 4,4% (EAAT2) eher gering ausgeprägt zu sein. 7 Tage nach dem Trauma kommt es dann zu einem Rückgang der EAAT1 Überexpression, während EAAT2 nach Noradrenalininfusion weiterhin um 7,3% stärker exprimiert wird, als in Ratten, die NaCl erhielten. 4 Wochen nach dem Trauma ist kein Effekt der Noradrenalininfusion auf die Expression der Glutamattransporter mehr nachweisbar. Außerdem hatte die Infusion von Noradrenalin keinen Einfluss auf die Glutamattransporterexpression in nichttraumatisierten Versuchstieren. Somit scheint Noradrenalin vor allem in der Akutphase nach einer traumatischen Schädigung seine Wirkung zu entfalten. Dies kann dadurch erklärt werden, dass Noradrenalin die intakte Blut-Hirn-Schranke nur sehr eingeschränkt passiert (Weil-Malherbe et al., 1959). Nur 2,7 – 4,5% des systemisch zirkulierenden Noradrenalins erreicht das Hirnparenchym bei intakter Blut-Hirn-Schranke (Hardebo et al., 1977). In weiteren Versuchen derselben Arbeitsgruppe konnte dann gezeigt werden, dass nach mechanischer oder osmotischer Öffnung der Blut-Hirn-Schranke die 3-4fache Menge des Noradrenalins die Barriere passiert und über die Aktivierung von katecholaminergen Betarezeptoren die lokale Durchblutung steigern kann (Edvinsson et al., 1978). Unter der Annahme einer beschädigten Blut-Hirn-Schranke ist es vorstellbar, dass wie im vorliegenden Versuch nach experimentellem Hirntrauma exogen zugeführtes Noradrenalin analog zu den Untersuchungen an Astrozytenkulturen die Zielzellen erreichen und die Mehrexpression der Glutamattransporter induzieren kann (Fahrig, 1993).

In der posttraumatischen Spätphase, 4 Wochen post contusionem, kommt es im Zuge von Reparaturprozessen zu einem Substanzdefekt nach dem Abbau der Nekrosezone sowie zu einer glialen Vernarbung im Bereich des Traumagebietes (Sutton et al., 1993). Die posttraumatisch geöffnete Blut-Hirn-Schranke schließt sich indes innerhalb der ersten Stunden bis Tage. So beschrieben Murakami et al. eine Schädigung der Barriere nach kortikaler Kälteläsion in Mäusen, die weniger als 24 Stunden anhielt (Murakami et al., 1999). Bascaya et al. berichten von einer zweiphasigen Öffnung der Schranke nach Traumaapplikation mittels des auch im vorliegenden Versuch verwendeten kortikalen Kontusionsmodells. Die maximale Schädigung der Blut-Hirn-Schranke würde demnach 4 bis 6 Stunden nach dem Trauma auftreten, gefolgt von einer Zunahme des Hirnödems mit einem Maximum nach 24 Stunden. 3 Tage nach dem Trauma wird von einer erneuten Öffnung der Barriere berichtet, wohingegen das Hirnödem ab dem 3. Tag abnimmt (Baskaya et al., 1997).

Es ist aber auch denkbar, dass die Blut-Hirn-Schranke funktionell länger beeinträchtigt ist, wodurch der Übertritt von Katecholaminen in das Hirnparenchym erleichtert werden könnte. Unter der Annahme, dass neben der mechanischen vor allem eine enzymatische Barriere für Katecholamine, bestehend aus perizytisch lokalisierten Monoaminoxidasen, existiert, könnte deren posttraumatische Dysfunktion für einen weiteren Übertritt von Noradrenalin in das Hirngewebe verantwortlich sein (Lasbennes et al., 1988). So fanden Mautes et al. erhöhte Konzentrationen von Noradrenalin im Serum und Liquor schädelhirntraumatisierter Patienten, denen exogen Noradrenalin zugeführt wurde. Hierbei waren die Konzentrationserhöhungen im Liquor unabhängig von einem mechanischen Schaden der Blut-Hirn-Schranke, welcher mittels des Serum/Liquor Albumin Quotienten ermittelt wurde. Weiterhin wurde zumindest in 10% der Patienten ein mechanischer Schrankenschaden noch 14 Tage nach dem Trauma beobachtet (Mautes et al., 2001). Die Beobachtungen von Mautes et al. stehen nur scheinbar im Widerspruch zu der Annahme, eine intakte Blut-Hirn-Schranke habe den Übertritt von exogen appliziertem Noradrenalin in das Hirngewebe im vorliegenden Versuch verhindert. So waren zum einen im Gegensatz zu den im vorliegenden Versuch untersuchten Kontrolltieren alle 29 eingeschlossenen Patienten schwer Schädel-Hirn traumatisiert. Zum anderen kann durch die Verwendung des Serum/Liquor-Albumin-Quotienten (Reiber Index) nur eine Aussage zur mechanischen, nicht aber zur funktionellen Integrität der Blut-Hirn-Schranke für Monoamine getroffen werden.

Somit ist die fehlende Induktion von Glutamattransporterproteinen nach 4 Wochen zum einen dadurch zu erklären, das möglicherweise ab dem 3. posttraumatischen Tag kein Noradrenalin mehr in das Hirngewebe übergetreten ist. Zum anderen wurde in dem hier verwendeten Studiendesign die kontinuierliche Infusion bereits nach 7 Tagen beendet. Demnach könnte die in der vorliegenden Arbeit beobachtete Glutamattransporterinduktion auch am 7. Tag nach dem Trauma die anhaltende Wirkung der kontinuierlichen Infusion von Noradrenalin sein, welches bei noch offener Blut-Hirn-Schranke in das Hirngewebe übergetreten ist.

Die dargestellten Ergebnisse zeigen, dass die kontinuierliche Infusion von niedrigkonzentriertem Noradrenalin im hier vorgestellten Versuchsaufbau neuroprotektiv nach experimenteller kortikaler Kontusion wirkte.

5.4 Neuroprotektion durch Beeinflussung des glutamatergen Transmission

5.4.1 Glutamattransporter

Auch in anderen Studien konnte gezeigt werden, dass über die Beeinflussung der Glutamataufnahme neuroprotektive Effekte erzielt werden können. So erhöhte Tacrolimus (FK506) die Aktivität von Glutamattransportern in Astrozytenkulturen und verhinderte einen stressbedingten Glutamatanstieg (Labrande et al., 2006). Dieser Effekt scheint über ein zytosolisches FK506-binding Protein vermittelt zu werden, welches selektiv GLT1 induziert und in Zellkulturen zu einem Schutz vor chronischer Exzitotoxizität führte (Ganel et al., 2006). Im Tierversuch konnte allerdings bisher kein Effekt auf die extrazelluläre Glutamatkonzentration nachgewiesen werden (Stover et al., 2003).

Auch die Gabe von Östrogen führt zu einer verstärkten Expression von GLT1 und GLAST auf mRNA und Proteinebene in Astrozytenkulturen. Dies resultiert in einer erhöhten Glutamataufnahme, die wahrscheinlich cAMP vermittelt ist. Hierbei scheint die Induktion über den nukleären Östrogenrezeptor vermittelt zu werden (Pawlak et al., 2005).

Überraschenderweise konnte auch von einigen Betalaktam Antibiotika gezeigt werden, dass sie die GLT1 Expression in Zellkulturen stimulieren. Bereits nach 48 Stunden wurde ein derartiger Effekt nachgewiesen. Auch hier konnte gezeigt werden, dass die vermehrte Glutamattransporterexpression mit einem erhöhten Glutamattransport einhergeht und auf diese Weise die Toleranz gegenüber chronischer Glutamattoxizität erhöht wurde (Rothstein et al., 2005). In vivo konnte dieser Effekt bisher jedoch noch nicht gezeigt werden (Sakowitz, persönliche Mitteilung).

5.5 Extrazelluläre Aminosäuren

5.5.1 Glutamat – Verminderung der Excitotoxizität

In der Untersuchung der extrazellulären Glutamatkonzentrationen bestätigen sich die Ergebnisse der Proteinanalyse zumindest zum Teil. Die Expressionszunahme der untersuchten Glutamattransporter scheint funktionell relevant zu sein, was zu einem verringerten posttraumatischen Anstieg der extrazellulären Glutamatkonzentration führt. So

kommt es 24 Stunden nach dem Trauma zu einem signifikanten Anstieg der Glutamatkonzentration in Versuchstieren, denen NaCl infundiert wurde auf $41,1 \pm 16,1 \mu\text{mol/l}$. Damit ist die Glutamatkonzentration mehr als 3fach erhöht im Vergleich zu Tieren, die Noradrenalin erhielten. Unabhängig von der Überlebenszeit sind die extrazellulären Glutamatkonzentrationen in traumatisierten Tieren, die mit NaCl behandelt wurden signifikant höher, als in Versuchstieren nach Noradrenalingabe ($28,68 \pm 17,1 \mu\text{mol/l}$ vs. $12,07 \pm 6,8 \mu\text{mol/l}$). Somit konnte in traumatisierten Tieren durch Noradrenalingabe der posttraumatische Anstieg der extrazellulären Glutamatkonzentration vermindert werden. Korrespondierend dazu sind die Traumavolumina 48 Stunden nach Noradrenalingabe deutlich verringert. Daher scheint durch die Verminderung der Glutamatoxizität in der posttraumatischen Frühphase eine Neuroprotektion erreicht worden zu sein. Dies kann als ein Hinweis auf die funktionelle Wirksamkeit einer gesteigerten noradrenalininduzierten Glutamattransporterexpression gesehen werden. Angesichts einer nur geringen Zunahme der Transporterexpression um ca. 5-10% ist aber auch denkbar, dass Noradrenalin synergistisch zu einer erhöhten Aktivität der vorhandenen Transportproteine geführt hat. Untersuchungen zur Aktivität der Transporter hätten allerdings den Rahmen der vorliegenden Arbeit gesprengt. Diese Frage sollte in zukünftigen Versuchen geklärt werden.

Verglichen mit anderen Arbeiten ist in der vorliegenden Untersuchung eine höhere durchschnittliche extrazelluläre Glutamatkonzentration in nicht traumatisierten Ratten gemessen worden. So sind von Stover et al. Normalwerte zwischen $4,8 \pm 1,1 \mu\text{mol/l}$ und $8 \pm 4 \mu\text{mol/l}$ in Ratten angegeben (Stover et al., 2003; Stover et al., 2004). Die hier gemessenen Konzentrationen in nichttraumatisierten Tieren liegen mit $16,76 \pm 14,76$ jedoch weitaus höher. Angesichts einer großen Standardabweichung kann der Unterschied durchaus methodisch bedingt sein. Die Art der eingesetzten Mikrodialysesonden mit unterschiedlicher Membranlänge und Molekulargewichtsgrenze, als auch die Platzierung der Sonde unterschieden sich in der vorliegenden im Vergleich zu den zitierten Arbeiten.

Analog zu früheren Studien wurde in der vorliegenden Arbeit ein signifikanter Glutamatanstieg 24 Stunden nach dem Trauma beobachtet. Die von Stover et al. zum Zeitpunkt 24 Stunden nach Trauma bestimmte perikontusionelle Glutamatkonzentration von $51 \pm 18,1 \mu\text{mol/l}$ in Kontrolltieren nach NaCl Infusion liegt in der gleichen Größenordnung wie die Konzentration der hier untersuchten NaCl-Tiere ($41,1 \pm 16,1 \mu\text{mol/l}$) (Stover et al., 2003). Auch beschrieben Stover et al. einen maximalen posttraumatischen Anstieg der

Glutamatkonzentration im Liquor nach 24 Stunden, dem ein Abfall bereits 48 Stunden nach dem Trauma folgte. Die erhöhten Glutamatkonzentrationen waren mit einer Zunahme des Hirnödems sowie gesteigerter neuronaler Aktivität im EEG assoziiert (Sakowitz et al., 2002; ; Stover und Unterberg, 2000).

Im Kontrast zu den hier vorliegenden Ergebnissen wurde allerdings auch ein signifikanter posttraumatischer Glutamatanstieg auf $28 \pm 6 \mu\text{mol/l}$ im Zusammenhang mit einer erhöhten EEG Aktivität nach Noradrenalininfusion gezeigt (Kroppenstedt et al., 2002). Die von Kroppenstedt et al. benutzten NoradrenalinKonzentrationen waren jedoch mit $1-2 \mu\text{g/kg/min}$ um ein Vielfaches höher als in der vorliegenden Untersuchung, ebenso betrug der Beobachtungszeitraum nur wenige Stunden nach dem Trauma. Durch die Anhebung des MABP auf Werte um 120 mmHg in der zitierten Arbeit kann es wie bereits diskutiert zu einer Zunahme der intraparenchymalen Blutung kommen mit konsekutiver Vergrößerung des Sekundärschadens gekommen sein, wodurch auch die erhöhten extrazellulären Glutamatkonzentrationen erklärbar wären.

Die Untersuchung von Schädel-Hirn traumatisierten Patienten bestätigt die im Tierversuch gezeigte Dynamik der Glutamatveränderungen zumindest zum Teil. So wurden von Yamamoto et al. in traumatisierten Patienten während der ersten beiden Tage deutlich erhöhte Glutamatkonzentrationen sowohl im Liquor als auch extrazellulär beobachtet, die ab dem 3. Tag kontinuierlich sanken (Yamamoto et al., 1999). Die gemessenen mittleren Konzentrationen waren jedoch mit ca. $15 \mu\text{mol/l}$ (extrazellulär) und $3,2 \pm 3,62 \mu\text{mol/l}$ (Liquor) deutlich geringer, als in den zitierten tierexperimentellen Arbeiten sowie der vorliegenden Untersuchung. Eine ähnliche Dynamik des Glutamatanstiegs im Liquor beschreiben auch Zhang et al.. In der Liquoruntersuchung schwer Schädel-Hirn traumatisierter Patienten zeigte sich ein Anstieg der Glutamatkonzentration innerhalb von 48h in 85% der Patienten, sowie ein anschließender Abfall der Konzentration mit zunehmender Besserung des neurologischen Status (Zhang et al., 2001). Auch Stoffel et al. berichteten von geringeren Glutamatwerten. So lagen in nichttraumatisierten Ratten die Glutamatkonzentrationen bei $1,45 \pm 0,61 \mu\text{mol/l}$. Unmittelbar posttraumatisch sind die Konzentrationen auf $9,16 \pm 3,32 \mu\text{mol/l}$ gestiegen, um dann innerhalb von 2 Stunden auf vortraumatische Werte abzufallen (Stoffel et al., 2002). Die Diskrepanz zu der vorliegenden Arbeit kann zum einen auf die Verwendung des Traumamodells einer Kälteläsion zurückzuführen sein. Hier kommt es lediglich zu einer lokalen Nekroseinduktion, während beim Modell des Controlled Cortical Impact durch Scherwirkung auch nicht direkt kontaktierte Areale primär geschädigt werden können. Außerdem wurde von

den Kollegen die Mikrodialysesonde nicht orthogonal zur Hirnoberfläche im Kortex, sondern schräg unterhalb der primären Läsion platziert.

5.5.2 Laktat und Glucose – der ischämische Hirnstoffwechsel

Neben der posttraumatischen Glutamaterhöhung zeigen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit auch einen cerebralen Laktat- und Glucoseanstieg. 48 Stunden nach dem Trauma war die Laktatkonzentration sowohl nach NaCl als auch nach Noradrenalininfusion signifikant erhöht im Vergleich zu nichttraumatisierten Tieren ($3,29 \pm 1,26$ und $1,99 \pm 0,64$ mmol/l vs. $1,19 \pm 0,58$ mmol/l, $p < 0,05$). Dieser Laktatanstieg ist nach Noradrenalininfusion eindeutig geringer ausgeprägt ($1,99 \pm 0,64$ vs. $3,29 \pm 1,26$ mmol/l, $p < 0,05$). Nach Noradrenalininfusion kam es ebenfalls zu einem Anstieg der extrazellulären Glucosekonzentration. Dieser posttraumatische Anstieg der Laktat- (Laktat $2,6 \pm 0,4$ vs. $0,9 \pm 0,1$ mmol/l) und Glucosekonzentration ($3,0 \pm 0,6$ vs. $1,2 \pm 0,1$ mmol/l) wird von Stover et al. ebenfalls beschrieben, allerdings bereits nach 24 Stunden (Stover et al., 2003).

Intraoperative Mikrodialyseuntersuchungen ergaben Normalwerte im menschlichen Gehirn von $1,8 \pm 0,18$ mmol/l für Glucose und $1,9 \pm 0,377$ mmol/l für Laktat, die damit durchaus in der Größenordnung der hier vorgestellten Ergebnisse liegen (Langemann et al., 2001).

Während Glucose unter physiologischen Bedingungen als das primäre Substrat zur Energiegewinnung des Hirnparenchyms gilt, spielt das Laktat zumindest zur vorübergehenden Energieversorgung unter hypoxischen Bedingungen eine wichtige Rolle (Levasseur et al., 2006; Schurr, 2006). Ein Anstieg der in der Mikrodialyse gemessenen extrazellulären Laktatkonzentrationen, aber auch der Glutamat- und Glycerolkonzentrationen korreliert eng mit dem cerebralen Glucosehypometabolismus und klinischen Ischämiezeichen (Sarrafzadeh et al., 2005). Somit scheint die kontinuierliche Noradrenalininfusion angesichts eines verminderten periläsionalen Laktatspiegels auch den posttraumatischen aeroben Energiestoffwechsel verbessert zu haben. Stover et al. berichtete von einer posttraumatischen Erhöhung der Glucosekonzentration in Serum und Liquor während der Infusion von Noradrenalin in Konzentrationen von 1-2 $\mu\text{g/kg/min}$ (Stover et al., 2002). Hierbei wurden extrazelluläre Glucosekonzentrationen zwischen 4 und 5 mmol/l gemessenen. Die zeitgleich bestimmten extrazellulären Laktatkonzentrationen waren demgegenüber nicht erhöht und lagen zwischen 0,5 und 2,5 mmol/l. In den vorliegenden Versuchen war, unter den traumatisierten Tieren, die No-

radrenalin erhielten, erst nach 48 Stunden die extrazelluläre Glucosekonzentration signifikant erhöht im Vergleich zu nichttraumatisierten Tieren ($3,79 \pm 1,08$ mmol/l vs. $2,41 \pm 0,70$ mmol/l). Der Mechanismus für den Anstieg der extrazellulären Glucosekonzentration ist bislang unklar. Die Serumglucosekonzentrationen zeigten keine Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen. Als Ursache für die von Stover et al. weitaus höher bestimmten posttraumatischen Glucosespiegel kommen zwei methodische Unterschiede in Betracht. Einerseits liegen die von Stover et al. benutzten Noradrenalkonzentrationen weitaus höher, andererseits ist der Beobachtungszeitraum von nur 3 Stunden wesentlich kürzer gewählt als in der vorliegenden Arbeit. In den frühen Beobachtungszeiträumen der vorliegenden Arbeit (4h, 24h) waren nach Noradrenalininfusion die extrazellulären Glucose- und Laktatkonzentrationen nicht verändert. Erst nach 48 Stunden kam es zu dem beschriebenen Anstieg der Glucosekonzentration im Hirngewebe. Allerdings kam es auch nach 48 Stunden zu einem signifikanten Anstieg der Laktatkonzentration in traumatisierten Tieren sowohl nach NaCl- als auch nach Noradrenalininfusion. Eine Erhöhung der Laktatkonzentration im Hirngewebe nach kortikaler Kontusion wurde auch von Prasad et al. beschrieben. Hier waren die Laktatwerte bereits nach 30 min. um das 6fache erhöht, wohingegen bis 24 Stunden nach dem Trauma 2fach erhöhte Konzentrationen verglichen mit nichttraumatisierten Tieren auftraten (Prasad et al., 1994). Insgesamt scheint in der vorliegenden Untersuchung der ischämische Stoffwechsel, wenn auch verspätet, sowohl in NaCl- als auch in Noradrenalin-behandelten Versuchstieren eingesetzt zu haben. Die signifikant niedrigeren Laktatkonzentrationen bei gleichzeitig höheren Glucosekonzentrationen deuten auf einen hirngewebsprotektiven Effekt des Noradrenalins hin, der auf einer Verminderung der posttraumatischen Ischämie beruhen kann.

5.6 Schlußfolgerung

Die intravenöse Gabe von Noradrenalin hat einen neuroprotektiven Effekt auf das traumatisch geschädigte Gehirn. Dieser Effekt hängt wesentlich von der Konzentration der kontinuierlichen Noradrenalininfusion ab. Während Noradrenalkonzentrationen ab $0,3 \mu\text{g/kg/min}$ über die Vergrößerung der intraparenchymalen Blutung auch negative Auswirkungen auf das geschädigte Areal haben, treten diese Effekte bei einer Konzentration von $0,15 \mu\text{g/kg/min}$ nicht auf. Die neuroprotektive Wirkung beruht offenbar auf einer Kombination verschiedener protektiver Mechanismen, darunter die Induktion der Glu-

tamattransporter EAAT1 und EAAT2. Dadurch wird einerseits der posttraumatische Anstieg des extrazellulären Glutamats vermindert, andererseits reflektiert sich die Verbesserung des postischämischen Stoffwechsels in verminderten Laktatkonzentrationen. Somit können die Beobachtungen früherer Studien hinsichtlich einer Verbesserung des funktionellen neurologischen Ergebnisses nach Stimulation noradrenerger Transmission zumindest teilweise erklärt werden (Feeney und Sutton, 1987; Feeney und Westerberg, 1990). Angesichts der nur geringen Expressionszunahme der untersuchten Glutamattransporter bei jedoch deutlichen neuroprotektiven Effekten nach 48 Stunden erscheint eine Kombination der unterschiedlichen Effekte des Noradrenalins wahrscheinlich.

6 Zusammenfassung

Fragestellung:

Der Einfluß einer kontinuierlichen Infusion von Noradrenalin nach traumatischer Hirnschädigung ist aufgrund beschriebener Vor- und Nachteile bisher nicht eindeutig geklärt. Nach traumatischer Schädigung des Gehirns kommt es zu einem exzessiven Anstieg der extrazellulären Glutamatkonzentration, welcher nach dem Modell der Exzitotoxizität für die sekundäre Größenzunahme der initialen Läsion mitverantwortlich gemacht wird. Ein Großteil des extrazellulären Glutamats wird durch Transportproteine für exzitatorische Aminosäuren (EAAT's) aufgenommen.

In Zellkulturen konnte eine α_1 Rezeptor vermittelte Steigerung der Glutamataufnahme beobachtet werden. Weiterhin wurde nach der Behandlung hirotraumatisierter Patienten mit α_1 Rezeptor Agonisten ein besseres neurologisches Ergebnis beschrieben.

In der vorliegenden Studie wurde die Wirkung einer kontinuierlichen Noradrenalininfusion auf die Glutamat Transporter Expression, die extrazellulären Glutamatkonzentrationen, sowie das Kontusionvolumen am Beispiel der Ratte untersucht.

Material und Methoden:

148 Sprague-Dawley Ratten wurden in Inhalationsnarkose mit Isofluran mittels des Contolled Impact Injury (CCII) Trauma Modells traumatisiert oder scheinoperiert. Zunächst wurde in Versuchsreihen mit abnehmenden NoradrenalinKonzentration (1 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$, 0,3 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$, 0.15 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$) die Auswirkung auf den arteriellen Mittel- druck (MABP) sowie die Traumagröße und das intraparenchymale Blutungsvolumen

der Versuchstiere 48 Stunden nach dem Trauma untersucht (n=28). Anschließend wurden Kontusionsvolumen und Glutamattransporterexpression 48 Stunden, 7 Tage und 4 Wochen nach Kontusion und kontinuierlicher Noradrenalininfusion (0.15 µg/kg/min) über osmotische Minipumpen (ALZET®) bestimmt (n=108). Kontrolltiere erhielten NaCl. MABP, Glucose und Blutgase wurden zu definierten Zeitpunkten gemessen. In 12 weiteren Tieren wurde die Auswirkung der Infusion auf den systolischen Blutdruck (SABP) durch nicht-invasive Blutdruckmessung bestimmt.

In einem zusätzlichen Versuchsaufbau wurden die extrazellulären Konzentrationen von Glucose, Laktat, Pyruvat und Glycerol zu den Zeitpunkten 4, 24 und 48 Stunden nach der Kontusion mittels zerebraler Mikrodialyse gemessen (n=60).

Ergebnisse:

Das intraparenchymale Blutungsvolumen war in den Versuchstiergruppen mit mittlerer und hoher NoradrenalinKonzentration (0,3 bzw. 1,0 µg/kg/min) um 157% und 142% signifikant erhöht im Vergleich zu traumatisierten Ratten, die NaCl erhielten ($58,6 \pm 14,2 \text{ mm}^3$ und $55,2 \pm 16,2 \text{ mm}^3$ vs. $22,8 \pm 5,8 \text{ mm}^3$, $p < 0,02$). Nur nach der Infusion von Noradrenalin in niedriger Konzentration (0.15 µg/kg/min) kam es zu einer signifikanten Reduktion des Kontusionsvolumens um 40%. Das intraparenchymale Blutungsvolumen war in dieser Gruppe im Vergleich zu Tieren, die NaCl erhielten nicht erhöht. Allerdings war die Reduktion des Kontusionsvolumens nach 7 Tagen und 4 Wochen nicht mehr nachweisbar.

Die Behandlung mit Noradrenalin führte zu einer signifikanten Reduktion der extrazellulären Konzentration von Glutamat ($41,1 \pm 16,1 \text{ µmol/l}$ vs. $13,81 \pm 5,05 \text{ µmol/l}$, $p < 0,05$) and Laktat ($3,29 \pm 1,26 \text{ mmol/l}$ vs. $1,99 \pm 0,64 \text{ mmol/l}$, $p < 0,05$) zu den Zeitpunkten 24 und 48 Stunden nach dem Trauma.

Die Expression der Glutamattransporter EAAT1 und EAAT2 waren 48 Stunden und 7 Tage nach dem Trauma um 5-10% erhöht.

Schlussfolgerung:

Die kontinuierliche niedrigdosierte Noradrenalininfusion ist neuroprotektiv nach experimentellem Hirntrauma. Zumindest ein Teil dieses Effektes beruht auf der Induktion von Glutamattransportern und erniedrigten extrazellulären Glutamatspiegeln.

Schlagwörter:

Glutamat, Schädel-Hirn-Trauma, Neuroprotektion, Mikrodialyse

.

7 Literaturverzeichnis

- Allen, J. W.; Ivanova, S. A.; Fan, L.; Espey, M. G.; Basile, A. S. und Faden, A. I. (1999): Group II metabotropic glutamate receptor activation attenuates traumatic neuronal injury and improves neurological recovery after traumatic brain injury, *J Pharmacol Exp Ther* 290 [1], Seite 112-20.
- Amara, S. G. und Fontana, A. C. (2002): Excitatory amino acid transporters: keeping up with glutamate, *Neurochem Int* 41 [5], Seite 313-8.
- Arriza, J. L.; Eliasof, S.; Kavanaugh, M. P. und Amara, S. G. (1997): Excitatory amino acid transporter 5, a retinal glutamate transporter coupled to a chloride conductance, *Proc Natl Acad Sci U S A* 94 [8], Seite 4155-60.
- Asgeirsson, B.; Grande, P. O. und Nordstrom, C. H. (1994): A new therapy of post-trauma brain oedema based on haemodynamic principles for brain volume regulation, *Intensive Care Med* 20 [4], Seite 260-7.
- Baethmann, A. und Kempfski, O. S. (1997): [Pathophysiology of brain edema], *Zentralbl Neurochir* 58 [1], Seite 20-9.
- Baethmann, A.; Maier-Hauff, K.; Schurer, L.; Lange, M.; Guggenbichler, C.; Vogt, W.; Jacob, K. und Kempfski, O. (1989): Release of glutamate and of free fatty acids in vasogenic brain edema, *J Neurosurg* 70 [4], Seite 578-91.
- Banik, N. L.; Hogan, E. L. und Hsu, C. Y. (1985): Molecular and anatomical correlates of spinal cord injury, *Cent Nerv Syst Trauma* 2 [2], Seite 99-107.
- Baskaya, M. K.; Rao, A. M.; Dogan, A.; Donaldson, D. und Dempsey, R. J. (1997): The biphasic opening of the blood-brain barrier in the cortex and hippocampus after traumatic brain injury in rats, *Neurosci Lett* 226 [1], Seite 33-6.
- Bellander, B. M.; Cantais, E.; Enblad, P.; Hutchinson, P.; Nordstrom, C. H.; Robertson, C.; Sahuquillo, J.; Smith, M.; Stocchetti, N.; Ungerstedt, U.; Unterberg, A. und Olsen, N. V. (2004): Consensus meeting on microdialysis in neurointensive care, *Intensive Care Med* 30 [12], Seite 2166-9.
- Bergles, D. E.; Doze, V. A.; Madison, D. V. und Smith, S. J. (1996): Excitatory actions of norepinephrine on multiple classes of hippocampal CA1 interneurons, *J Neurosci* 16 [2], Seite 572-85.
- Borges, N.; Shi, F.; Azevedo, I. und Audus, K. L. (1994): Changes in brain microvessel endothelial cell monolayer permeability induced by adrenergic drugs, *Eur J Pharmacol* 269 [2], Seite 243-8.
- Bryan, R. M., Jr.; Cherian, L. und Robertson, C. (1995): Regional cerebral blood flow after controlled cortical impact injury in rats, *Anesth Analg* 80 [4], Seite 687-95.
- Bullock, R. (1995): Mannitol and other diuretics in severe neurotrauma, *New Horiz* 3 [3], Seite 448-52.
- Casado, M.; Bendahan, A.; Zafra, F.; Danbolt, N. C.; Aragon, C.; Gimenez, C. und Kanner, B. I. (1993): Phosphorylation and modulation of brain glutamate transporters by protein kinase C, *J Biol Chem* 268 [36], Seite 27313-7.
- Chen, Y. und Swanson, R. A. (2003): The glutamate transporters EAAT2 and EAAT3 mediate cysteine uptake in cortical neuron cultures, *J Neurochem* 84 [6], Seite 1332-9.
- Chesnut, R. M.; Marshall, L. F.; Klauber, M. R.; Blunt, B. A.; Baldwin, N.; Eisenberg, H. M.; Jane, J. A.; Marmarou, A. und Foulkes, M. A. (1993): The role of secondary brain injury in determining outcome from severe head injury, *J Trauma* 34 [2], Seite 216-22.
- Choi, D. W. (1992): Excitotoxic cell death, *J Neurobiol* 23 [9], Seite 1261-76.

- Conti, F.; DeBiasi, S.; Minelli, A.; Rothstein, J. D. und Melone, M. (1998): EAAC1, a high-affinity glutamate transporter, is localized to astrocytes and gabaergic neurons besides pyramidal cells in the rat cerebral cortex, *Cereb Cortex* 8 [2], Seite 108-16.
- Conzen, P. F.; Vollmar, B.; Habazettl, H.; Frink, E. J.; Peter, K. und Messmer, K. (1992): Systemic and regional hemodynamics of isoflurane and sevoflurane in rats, *Anesth Analg* 74 [1], Seite 79-88.
- Crowder, J. M. und Bradford, H. F. (1987): Inhibitory effects of noradrenaline and dopamine on calcium influx and neurotransmitter glutamate release in mammalian brain slices, *Eur J Pharmacol* 143 [3], Seite 343-52.
- D'Avella, D.; Germano, A.; Santoro, G.; Costa, G.; Zuccarello, M.; Caputi, A. P.; Hayes, R. L. und Tomasello, F. (1990): Effect of experimental subarachnoid hemorrhage on CSF eicosanoids in the rat, *J Neurotrauma* 7 [3], Seite 121-9.
- Danbolt, N. C. (2001): Glutamate uptake, *Prog Neurobiol* 65 [1], Seite 1-105.
- Danbolt, N. C.; Storm-Mathisen, J. und Kanner, B. I. (1992): An $[Na^+ + K^+]_{coupled}$ L-glutamate transporter purified from rat brain is located in glial cell processes, *Neuroscience* 51 [2], Seite 295-310.
- Daneyemez, M. (1999): Microangiographic changes following cerebral contusion in rats, *Neuroscience* 92 [2], Seite 783-90.
- Davis, K. E.; Straff, D. J.; Weinstein, E. A.; Bannerman, P. G.; Correale, D. M.; Rothstein, J. D. und Robinson, M. B. (1998): Multiple signaling pathways regulate cell surface expression and activity of the excitatory amino acid carrier 1 subtype of Glu transporter in C6 glioma, *J Neurosci* 18 [7], Seite 2475-85.
- Dixon, C. E.; Clifton, G. L.; Lighthall, J. W.; Yaghamai, A. A. und Hayes, R. L. (1991): A controlled cortical impact model of traumatic brain injury in the rat, *J Neurosci Methods* 39 [3], Seite 253-62.
- Dunn-Meynell, A. A.; Hassanain, M. und Levin, B. E. (1998): Norepinephrine and traumatic brain injury: a possible role in post-traumatic edema, *Brain Res* 800 [2], Seite 245-52.
- Dunn-Meynell, A. A.; Yarlagadda, Y. und Levin, B. E. (1997): Alpha 1-adrenoceptor blockade increases behavioral deficits in traumatic brain injury, *J Neurotrauma* 14 [1], Seite 43-52.
- Edvinsson, L.; Hardebo, J. E.; MacKenzie, E. T. und Owman, C. (1978): Effect of exogenous noradrenaline on local cerebral blood flow after osmotic opening of the blood-brain barrier in the rat, *J Physiol* 274, Seite 149-56.
- Eggert, H. R.; Kiessling, M. und Kleihues, P. (1985): Time course and spatial distribution of neodymium: yttrium-aluminum-garnet (Nd:YAG) laser-induced lesions in the rat brain, *Neurosurgery* 16 [4], Seite 443-8.
- Eker, C.; Asgeirsson, B.; Grande, P. O.; Schalen, W. und Nordstrom, C. H. (1998): Improved outcome after severe head injury with a new therapy based on principles for brain volume regulation and preserved microcirculation, *Crit Care Med* 26 [11], Seite 1881-6.
- Enblad, P.; Frykholm, P.; Valtysson, J.; Silander, H. C.; Andersson, J.; Fasth, K. J.; Watanabe, Y.; Langstrom, B.; Hillered, L. und Persson, L. (2001): Middle cerebral artery occlusion and reperfusion in primates monitored by microdialysis and sequential positron emission tomography, *Stroke* 32 [7], Seite 1574-80.
- Engstrom, M.; Polito, A.; Reinstrup, P.; Romner, B.; Ryding, E.; Ungerstedt, U. und Nordstrom, C. H. (2005): Intracerebral microdialysis in severe brain trauma: the importance of catheter location, *J Neurosurg* 102 [3], Seite 460-9.
- Eriskat, J.; Schurer, L.; Kempfski, O. und Baethmann, A. (1994): Growth kinetics of a primary brain tissue necrosis from a focal lesion, *Acta Neurochir Suppl (Wien)* 60, Seite 425-7.
- Faden, A. I.; Chan, P. H. und Longar, S. (1987): Alterations in lipid metabolism, Na^+, K^+ -ATPase activity, and tissue water content of spinal cord following experimental traumatic injury, *J Neurochem* 48 [6], Seite 1809-16.

- Faden, A. I.; Vink, R. und McIntosh, T. K. (1989): Thyrotropin-releasing hormone and central nervous system trauma, *Ann N Y Acad Sci* 553, Seite 380-4.
- Fahrig, T. (1993): Receptor subtype involved and mechanism of norepinephrine-induced stimulation of glutamate uptake into primary cultures of rat brain astrocytes, *Glia* 7 [3], Seite 212-8.
- Fairman, W. A.; Vandenberg, R. J.; Arriza, J. L.; Kavanaugh, M. P. und Amara, S. G. (1995): An excitatory amino-acid transporter with properties of a ligand-gated chloride channel, *Nature* 375 [6532], Seite 599-603.
- Fakhry, S. M.; Trask, A. L.; Waller, M. A. und Watts, D. D. (2004): Management of brain-injured patients by an evidence-based medicine protocol improves outcomes and decreases hospital charges, *J Trauma* 56 [3], Seite 492-9; discussion 499-500.
- Farkas, O.; Lifshitz, J. und Povlishock, J. T. (2006): Mechanoporation induced by diffuse traumatic brain injury: an irreversible or reversible response to injury?, *J Neurosci* 26 [12], Seite 3130-40.
- Feeney, D. M. und Sutton, R. L. (1987): Pharmacotherapy for recovery of function after brain injury, *Crit Rev Neurobiol* 3 [2], Seite 135-97.
- Feeney, D. M. und Westerberg, V. S. (1990): Norepinephrine and brain damage: alpha noradrenergic pharmacology alters functional recovery after cortical trauma, *Can J Psychol* 44 [2], Seite 233-52.
- Fillenz, M.; Lowry, J. P.; Boutelle, M. G. und Fray, A. E. (1999): The role of astrocytes and noradrenaline in neuronal glucose metabolism, *Acta Physiol Scand* 167 [4], Seite 275-84.
- Firsching, R. und Frowein, R. A. (1990): Multimodality evoked potentials and early prognosis in comatose patients, *Neurosurg Rev* 13 [2], Seite 141-6.
- Frandsen, A. und Schousboe, A. (1990): Development of excitatory amino acid induced cytotoxicity in cultured neurons, *Int J Dev Neurosci* 8 [2], Seite 209-16.
- Frowein, R. A.; Terhaag, D.; auf der Haar, K.; Richard, K. E. und Firsching, R. (1992): Rehabilitation after severe head injury, *Acta Neurochir Suppl (Wien)* 55, Seite 72-4.
- Ganel, R.; Ho, T.; Maragakis, N. J.; Jackson, M.; Steiner, J. P. und Rothstein, J. D. (2006): Selective up-regulation of the glial Na⁺-dependent glutamate transporter GLT1 by a neuroimmunophilin ligand results in neuroprotection, *Neurobiol Dis* 21 [3], Seite 556-67.
- Gegelashvili, G.; Civenni, G.; Racagni, G.; Danbolt, N. C.; Schousboe, I. und Schousboe, A. (1996): Glutamate receptor agonists up-regulate glutamate transporter GLAST in astrocytes, *Neuroreport* 8 [1], Seite 261-5.
- Gegelashvili, G.; Dehnes, Y.; Danbolt, N. C. und Schousboe, A. (2000): The high-affinity glutamate transporters GLT1, GLAST, and EAAT4 are regulated via different signalling mechanisms, *Neurochem Int* 37 [2-3], Seite 163-70.
- Gegelashvili, G. und Schousboe, A. (1997): High affinity glutamate transporters: regulation of expression and activity, *Mol Pharmacol* 52 [1], Seite 6-15.
- Golding, E. M.; Robertson, C. S. und Bryan, R. M., Jr. (2000): L-arginine partially restores the diminished CO₂ reactivity after mild controlled cortical impact injury in the adult rat, *J Cereb Blood Flow Metab* 20 [5], Seite 820-8.
- Graham, D; Gennarelli, T und McIntosh, T (2002): Trauma, Graham, D und Lantos, P, *Greenfield's Neuropathology* Seite 823 - 898, Arnold, London.
- Hall, E. D. (1997): Injury mechanisms and therapies: Free radicals and lipid peroxidation., Narayan, RK; Wilberger, JE und Povlishock, J. T., *Neurotrauma* Seite 1405 - 1419, McGraw Hill, New York.
- Hall, E. D.; Andrus, P. K.; Smith, S. L.; Fleck, T. J.; Scherch, H. M.; Lutzke, B. S.; Sawada, G. A.; Althaus, J. S.; Vonvoigtlander, P. F.; Padbury, G. E.; Larson, P. G.; Palmer, J. R. und Bundy, G. L. (1997): Pyrrolopyrimidines: novel brain-penetrating antioxidants with neu-

- roprotective activity in brain injury and ischemia models, *J Pharmacol Exp Ther* 281 [2], Seite 895-904.
- Hall, E. D.; Braugher, J. M.; Yonkers, P. A.; Smith, S. L.; Linseman, K. L.; Means, E. D.; Scherch, H. M.; Von Voigtlander, P. F.; Lahti, R. A. und Jacobsen, E. J. (1991): U-78517F: a potent inhibitor of lipid peroxidation with activity in experimental brain injury and ischemia, *J Pharmacol Exp Ther* 258 [2], Seite 688-94.
- Hamani, C.; Luer, M. S. und Dujovny, M. (1997): Microdialysis in the human brain: review of its applications, *Neurol Res* 19 [3], Seite 281-8.
- Hamill, R. W.; Woolf, P. D.; McDonald, J. V.; Lee, L. A. und Kelly, M. (1987): Catecholamines predict outcome in traumatic brain injury, *Ann Neurol* 21 [5], Seite 438-43.
- Hansson, E. und Ronnback, L. (1991): Receptor regulation of the glutamate, GABA and taurine high-affinity uptake into astrocytes in primary culture, *Brain Res* 548 [1-2], Seite 215-21.
- Hardebo, J. E.; Edvinsson, L.; MacKenzie, E. T. und Owman, C. (1977): Regional brain uptake of exogenous noradrenaline, and its effect on local cerebral blood flow after osmotic or mechanical opening of the blood-brain barrier in rats, *Acta Neurol Scand Suppl* 64, Seite 92-3.
- Hardebo, J. E.; Edvinsson, L.; Mackenzie, E. T. und Owman, C. (1977): Regional brain uptake of noradrenaline following mechanical or osmotic opening of the blood-brain barrier, *Acta Physiol Scand* 101 [3], Seite 342-50.
- Hasselmo, M. E.; Linster, C.; Patil, M.; Ma, D. und Cekic, M. (1997): Noradrenergic suppression of synaptic transmission may influence cortical signal-to-noise ratio, *J Neurophysiol* 77 [6], Seite 3326-39.
- Haugeto, O.; Ullensvang, K.; Levy, L. M.; Chaudhry, F. A.; Honore, T.; Nielsen, M.; Lehre, K. P. und Danbolt, N. C. (1996): Brain glutamate transporter proteins form homomultimers, *J Biol Chem* 271 [44], Seite 27715-22.
- Hillered, L.; Persson, L.; Ponten, U. und Ungerstedt, U. (1990): Neurometabolic monitoring of the ischaemic human brain using microdialysis, *Acta Neurochir (Wien)* 102 [3-4], Seite 91-7.
- Hillered, L.; Vespa, P. M. und Hovda, D. A. (2005): Translational neurochemical research in acute human brain injury: the current status and potential future for cerebral microdialysis, *J Neurotrauma* 22 [1], Seite 3-41.
- Holtzer, S.; Vigue, B.; Ract, C.; Samii, K. und Escourrou, P. (2001): Hypoxia-hypotension decreases pressor responsiveness to exogenous catecholamines after severe traumatic brain injury in rats, *Crit Care Med* 29 [8], Seite 1609-14.
- Hu, Z.; Azhar, S. und Hoffman, B. B. (1992): Prolonged activation of alpha 1 adrenoceptors induces down-regulation of protein kinase C in vascular smooth muscle, *J Cardiovasc Pharmacol* 20 [6], Seite 982-9.
- Huang, R. und Hertz, L. (1995): Noradrenaline-induced stimulation of glutamine metabolism in primary cultures of astrocytes, *J Neurosci Res* 41 [5], Seite 677-83.
- Hukkelhoven, C. W.; Steyerberg, E. W.; Rampen, A. J.; Farace, E.; Habbema, J. D.; Marshall, L. F.; Murray, G. D. und Maas, A. I. (2003): Patient age and outcome following severe traumatic brain injury: an analysis of 5600 patients, *J Neurosurg* 99 [4], Seite 666-73.
- Jackson, M.; Song, W.; Liu, M. Y.; Jin, L.; Dykes-Hoberg, M.; Lin, C. I.; Bowers, W. J.; Federoff, H. J.; Sternweis, P. C. und Rothstein, J. D. (2001): Modulation of the neuronal glutamate transporter EAAT4 by two interacting proteins, *Nature* 410 [6824], Seite 89-93.
- Jahr, C. E. und Stevens, C. F. (1990): A quantitative description of NMDA receptor-channel kinetic behavior, *J Neurosci* 10 [6], Seite 1830-7.
- Kanai, Y. und Hediger, M. A. (1992): Primary structure and functional characterization of a high-affinity glutamate transporter, *Nature* 360 [6403], Seite 467-71.

- Kerkerian, L.; Dusticier, N. und Nieoullon, A. (1987): Modulatory effect of dopamine on high-affinity glutamate uptake in the rat striatum, *J Neurochem* 48 [4], Seite 1301-6.
- Kiening, K. L.; van Landeghem, F. K.; Schreiber, S.; Thomale, U. W.; von Deimling, A.; Unterberg, A. W. und Stover, J. F. (2002): Decreased hemispheric Aquaporin-4 is linked to evolving brain edema following controlled cortical impact injury in rats, *Neurosci Lett* 324 [2], Seite 105-8.
- Kochanek, P. M.; Marion, D. W.; Zhang, W.; Schiding, J. K.; White, M.; Palmer, A. M.; Clark, R. S.; O'Malley, M. E.; Styren, S. D.; Ho, C. und et al. (1995): Severe controlled cortical impact in rats: assessment of cerebral edema, blood flow, and contusion volume, *J Neurotrauma* 12 [6], Seite 1015-25.
- Koizumi, H.; Fujisawa, H.; Ito, H.; Maekawa, T.; Di, X. und 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 [2], Seite 304-12.
- Komuro, H. und Rakic, P. (1993): Modulation of neuronal migration by NMDA receptors, *Science* 260 [5104], Seite 95-7.
- Kontos, H. A. und Wei, E. P. (1986): Superoxide production in experimental brain injury, *J Neurosurg* 64 [5], Seite 803-7.
- Kroppenstedt, S. N.; Kern, M.; Thomale, U. W.; Schneider, G. H.; Lanksch, W. R. und Unterberg, A. W. (1999): Effect of cerebral perfusion pressure on contusion volume following impact injury, *J Neurosurg* 90 [3], Seite 520-6.
- Kroppenstedt, S. N.; Sakowitz, O. W.; Thomale, U. W.; Unterberg, A. W. und Stover, J. F. (2002): Influence of norepinephrine and dopamine on cortical perfusion, EEG activity, extracellular glutamate, and brain edema in rats after controlled cortical impact injury, *J Neurotrauma* 19 [11], Seite 1421-32.
- Kroppenstedt, S. N.; Sakowitz, O. W.; Thomale, U. W.; Unterberg, A. W. und Stover, J. F. (2002): Norepinephrine is superior to dopamine in increasing cortical perfusion following controlled cortical impact injury in rats, *Acta Neurochir Suppl* 81, Seite 225-7.
- Kroppenstedt, S. N.; Stover, J. F. und Unterberg, A. W. (2000): Effects of dopamine on post-traumatic cerebral blood flow, brain edema, and cerebrospinal fluid glutamate and hypoxanthine concentrations, *Crit Care Med* 28 [12], Seite 3792-8.
- Kroppenstedt, S. N.; Thomale, U. W.; Griebenow, M.; Sakowitz, O. W.; Schaser, K. D.; Mayr, P. S.; Unterberg, A. W. und Stover, J. F. (2003): Effects of early and late intravenous norepinephrine infusion on cerebral perfusion, microcirculation, brain-tissue oxygenation, and edema formation in brain-injured rats, *Crit Care Med* 31 [8], Seite 2211-21.
- Kugler, P. und Schmitt, A. (1999): Glutamate transporter EAAC1 is expressed in neurons and glial cells in the rat nervous system, *Glia* 27 [2], Seite 129-42.
- Labrande, C.; Velly, L.; Canolle, B.; Guillet, B.; Masméjean, F.; Nieoullon, A. und Pisano, P. (2006): Neuroprotective effects of tacrolimus (FK506) in a model of ischemic cortical cell cultures: role of glutamate uptake and FK506 binding protein 12 kDa, *Neuroscience* 137 [1], Seite 231-9.
- Langemann, H.; Alessandri, B.; Mendelowitsch, A.; Feuerstein, T.; Landolt, H. und Gratzl, O. (2001): Extracellular levels of glucose and lactate measured by quantitative microdialysis in the human brain, *Neurol Res* 23 [5], Seite 531-6.
- Lasbennes, F.; Lacombe, P. und Seylaz, J. (1988): Effect of monoamine oxidase inhibition on the regional cerebral blood flow response to circulating noradrenaline, *Brain Res* 454 [1-2], Seite 205-11.
- Lehre, K. P.; Levy, L. M.; Ottersen, O. P.; Storm-Mathisen, J. und Danbolt, N. C. (1995): Differential expression of two glial glutamate transporters in the rat brain: quantitative and immunocytochemical observations, *J Neurosci* 15 [3 Pt 1], Seite 1835-53.

- Levasseur, J. E.; Alessandri, B.; Reinert, M.; Clausen, T.; Zhou, Z.; Altememi, N. und Bullock, M. R. (2006): Lactate, not glucose, up-regulates mitochondrial oxygen consumption both in sham and lateral fluid percussed rat brains, *Neurosurgery* 59 [5], Seite 1122-30; discussion 1130-1.
- Levy, L. M.; Lehre, K. P.; Rolstad, B. und Danbolt, N. C. (1993): A monoclonal antibody raised against an [Na(+)+K+]coupled L-glutamate transporter purified from rat brain confirms glial cell localization, *FEBS Lett* 317 [1-2], Seite 79-84.
- Lin, C. I.; Orlov, I.; Ruggiero, A. M.; Dykes-Hoberg, M.; Lee, A.; Jackson, M. und Rothstein, J. D. (2001): Modulation of the neuronal glutamate transporter EAAC1 by the interacting protein GTRAP3-18, *Nature* 410 [6824], Seite 84-8.
- Lindsberg, P. J.; Frerichs, K. U.; Burris, J. A.; Hallenbeck, J. M. und Feuerstein, G. (1991): Cortical microcirculation in a new model of focal laser-induced secondary brain damage, *J Cereb Blood Flow Metab* 11 [1], Seite 88-98.
- Lortet, S.; Samuel, D.; Had-Aissouni, L.; Masméjean, F.; Kerkerian-Le Goff, L. und Pisano, P. (1999): Effects of PKA and PKC modulators on high affinity glutamate uptake in primary neuronal cell cultures from rat cerebral cortex, *Neuropharmacology* 38 [3], Seite 395-402.
- Maas, A. I.; Dearden, M.; Teasdale, G. M.; Braakman, R.; Cohadon, F.; Iannotti, F.; Karimi, A.; Lapiere, F.; Murray, G.; Ohman, J.; Persson, L.; Servadei, F.; Stocchetti, N. und Unterberg, A. (1997): EBIC-guidelines for management of severe head injury in adults. European Brain Injury Consortium, *Acta Neurochir (Wien)* 139 [4], Seite 286-94.
- MacKenzie, E. T.; McCulloch, J. und Harper, A. M. (1976): Influence of endogenous norepinephrine on cerebral blood flow and metabolism, *Am J Physiol* 231 [2], Seite 489-94.
- MacKenzie, E. T.; McCulloch, J.; O'Kean, M.; Pickard, J. D. und Harper, A. M. (1976): Cerebral circulation and norepinephrine: relevance of the blood-brain barrier, *Am J Physiol* 231 [2], Seite 483-8.
- Mautes, A. E.; Muller, M.; Cortbus, F.; Schwerdtfeger, K.; Maier, B.; Holanda, M.; Nacimiento, A.; Marzi, I. und Steudel, W. I. (2001): Alterations of norepinephrine levels in plasma and CSF of patients after traumatic brain injury in relation to disruption of the blood-brain barrier, *Acta Neurochir (Wien)* 143 [1], Seite 51-7; discussion 57-8.
- McDonald, J. W. und Johnston, M. V. (1990): Physiological and pathophysiological roles of excitatory amino acids during central nervous system development, *Brain Res Brain Res Rev* 15 [1], Seite 41-70.
- Meyerson, B. A.; Linderoth, B.; Karlsson, H. und Ungerstedt, U. (1990): Microdialysis in the human brain: extracellular measurements in the thalamus of parkinsonian patients, *Life Sci* 46 [4], Seite 301-8.
- Miller, B. R.; Dorner, J. L.; Shou, M.; Sari, Y.; Barton, S. J.; Sengelau, D. R.; Kennedy, R. T. und Rebec, G. V. (2008): Up-regulation of GLT1 expression increases glutamate uptake and attenuates the Huntington's disease phenotype in the R6/2 mouse, *Neuroscience*.
- Miller, J. D. (1985): Head injury and brain ischaemia--implications for therapy, *Br J Anaesth* 57 [1], Seite 120-30.
- Moreau, P.; d'Uscio, L. V. und Luscher, T. F. (1998): Structure and reactivity of small arteries in aging, *Cardiovasc Res* 37 [1], Seite 247-53.
- Mori, K.; Ozaki, E.; Zhang, B.; Yang, L.; Yokoyama, A.; Takeda, I.; Maeda, N.; Sakanaka, M. und Tanaka, J. (2002): Effects of norepinephrine on rat cultured microglial cells that express alpha1, alpha2, beta1 and beta2 adrenergic receptors, *Neuropharmacology* 43 [6], Seite 1026-34.
- Murakami, K.; Kondo, T.; Yang, G.; Chen, S. F.; Morita-Fujimura, Y. und Chan, P. H. (1999): Cold injury in mice: a model to study mechanisms of brain edema and neuronal apoptosis, *Prog Neurobiol* 57 [3], Seite 289-99.

- Murray, G. D.; Teasdale, G. M.; Braakman, R.; Cohadon, F.; Dearden, M.; Iannotti, F.; Karimi, A.; Lapierre, F.; Maas, A.; Ohman, J.; Persson, L.; Servadei, F.; Stocchetti, N.; Trojanowski, T. und Unterberg, A. (1999): The European Brain Injury Consortium survey of head injuries, *Acta Neurochir (Wien)* 141 [3], Seite 223-36.
- Nicholls, D. und Attwell, D. (1990): The release and uptake of excitatory amino acids, *Trends Pharmacol Sci* 11 [11], Seite 462-8.
- Noh, J. S.; Kim, E. Y.; Kang, J. S.; Kim, H. R.; Oh, Y. J. und Gwag, B. J. (1999): Neurotoxic and neuroprotective actions of catecholamines in cortical neurons, *Exp Neurol* 159 [1], Seite 217-24.
- O'Shea, R. D. (2002): Roles and regulation of glutamate transporters in the central nervous system, *Clin Exp Pharmacol Physiol* 29 [11], Seite 1018-23.
- Ohkuma, S. und Katsura, M. (2001): Nitric oxide and peroxynitrite as factors to stimulate neurotransmitter release in the CNS, *Prog Neurobiol* 64 [1], Seite 97-108.
- Olney, J. W. (1969): Glutamate-induced retinal degeneration in neonatal mice. Electron microscopy of the acutely evolving lesion, *J Neuropathol Exp Neurol* 28 [3], Seite 455-74.
- Palmer, A. M.; Marion, D. W.; Botscheller, M. L.; Swedlow, P. E.; Styren, S. D. und DeKosky, S. T. (1993): Traumatic brain injury-induced excitotoxicity assessed in a controlled cortical impact model, *J Neurochem* 61 [6], Seite 2015-24.
- Patt, S. und Brodhun, M. (1999): Neuropathological sequelae of traumatic injury in the brain. An overview, *Exp Toxicol Pathol* 51 [2], Seite 119-23.
- Pawlak, J.; Brito, V.; Koppers, E. und Beyer, C. (2005): Regulation of glutamate transporter GLAST and GLT-1 expression in astrocytes by estrogen, *Brain Res Mol Brain Res* 138 [1], Seite 1-7.
- Pellerin, L.; Stolz, M.; Sorg, O.; Martin, J. L.; Deschepper, C. F. und Magistretti, P. J. (1997): Regulation of energy metabolism by neurotransmitters in astrocytes in primary culture and in an immortalized cell line, *Glia* 21 [1], Seite 74-83.
- Piek, J. und Jantzen, J. P. (2000): [Recommendations for early care of patients with skull and brain trauma in multiple injuries (prepared by the German Interdisciplinary Union for Intensive and Trauma Care (DIVI) on November 5, 1999], *Zentralbl Neurochir* 61 [1], Seite 50-6.
- Pines, G.; Danbolt, N. C.; Bjoras, M.; Zhang, Y.; Bendahan, A.; Eide, L.; Koepsell, H.; Storm-Mathisen, J.; Seeberg, E. und Kanner, B. I. (1992): Cloning and expression of a rat brain L-glutamate transporter, *Nature* 360 [6403], Seite 464-7.
- Pogun, S. und Kuhar, M. J. (1994): Regulation of neurotransmitter reuptake by nitric oxide, *Ann N Y Acad Sci* 738, Seite 305-15.
- Prasad, M. R.; Ramaiah, C.; McIntosh, T. K.; Dempsey, R. J.; Hipkens, S. und Yurek, D. (1994): Regional levels of lactate and norepinephrine after experimental brain injury, *J Neurochem* 63 [3], Seite 1086-94.
- Prasad, M. R.; Tzigaret, C. M.; Smith, D.; Soares, H. und McIntosh, T. K. (1992): Decreased alpha 1-adrenergic receptors after experimental brain injury, *J Neurotrauma* 9 [3], Seite 269-79.
- Queen, S. A.; Chen, M. J. und Feeney, D. M. (1997): d-Amphetamine attenuates decreased cerebral glucose utilization after unilateral sensorimotor cortex contusion in rats, *Brain Res* 777 [1-2], Seite 42-50.
- Rajan, I. und Cline, H. T. (1998): Glutamate receptor activity is required for normal development of tectal cell dendrites in vivo, *J Neurosci* 18 [19], Seite 7836-46.
- Rao, V. L.; Baskaya, M. K.; Dogan, A.; Rothstein, J. D. und Dempsey, R. J. (1998): Traumatic brain injury down-regulates glial glutamate transporter (GLT-1 and GLAST) proteins in rat brain, *J Neurochem* 70 [5], Seite 2020-7.

- Rao, V. L.; Dogan, A.; Bowen, K. K.; Todd, K. G. und Dempsey, R. J. (2001): Antisense knock-down of the glial glutamate transporter GLT-1 exacerbates hippocampal neuronal damage following traumatic injury to rat brain, *Eur J Neurosci* 13 [1], Seite 119-28.
- Rao, V. L.; Dogan, A.; Todd, K. G.; Bowen, K. K.; Kim, B. T.; Rothstein, J. D. und Dempsey, R. J. (2001): Antisense knockdown of the glial glutamate transporter GLT-1, but not the neuronal glutamate transporter EAAC1, exacerbates transient focal cerebral ischemia-induced neuronal damage in rat brain, *J Neurosci* 21 [6], Seite 1876-83.
- Rosner, M. J.; Rosner, S. D. und Johnson, A. H. (1995): Cerebral perfusion pressure: management protocol and clinical results, *J Neurosurg* 83 [6], Seite 949-62.
- Rossi, D. J. und Slater, N. T. (1993): The developmental onset of NMDA receptor-channel activity during neuronal migration, *Neuropharmacology* 32 [11], Seite 1239-48.
- Rothstein, J. D.; Dykes-Hoberg, M.; Pardo, C. A.; Bristol, L. A.; Jin, L.; Kuncl, R. W.; Kanai, Y.; Hediger, M. A.; Wang, Y.; Schielke, J. P. und Welty, D. F. (1996): Knockout of glutamate transporters reveals a major role for astroglial transport in excitotoxicity and clearance of glutamate, *Neuron* 16 [3], Seite 675-86.
- Rothstein, J. D.; Jin, L.; Dykes-Hoberg, M. und Kuncl, R. W. (1993): Chronic inhibition of glutamate uptake produces a model of slow neurotoxicity, *Proc Natl Acad Sci U S A* 90 [14], Seite 6591-5.
- Rothstein, J. D.; Martin, L.; Levey, A. I.; Dykes-Hoberg, M.; Jin, L.; Wu, D.; Nash, N. und Kuncl, R. W. (1994): Localization of neuronal and glial glutamate transporters, *Neuron* 13 [3], Seite 713-25.
- Rothstein, J. D.; Patel, S.; Regan, M. R.; Haenggeli, C.; Huang, Y. H.; Bergles, D. E.; Jin, L.; Dykes Hoberg, M.; Vidensky, S.; Chung, D. S.; Toan, S. V.; Bruijn, L. I.; Su, Z. Z.; Gupta, P. und Fisher, P. B. (2005): Beta-lactam antibiotics offer neuroprotection by increasing glutamate transporter expression, *Nature* 433 [7021], Seite 73-7.
- Sakowitz, O. W.; Unterberg, A. W. und Stover, J. F. (2002): Neuronal activity determined by quantitative EEG and cortical microdialysis is increased following controlled cortical impact injury in rats, *Acta Neurochir Suppl* 81, Seite 221-3.
- Sarrafzadeh, A.; Haux, D.; Plotkin, M.; Ludemann, L.; Amthauer, H. und Unterberg, A. (2005): Bedside microdialysis reflects dysfunction of cerebral energy metabolism in patients with aneurysmal subarachnoid hemorrhage as confirmed by 15 O-H₂ O-PET and 18 F-FDG-PET, *J Neuroradiol* 32 [5], Seite 348-51.
- Schubert, D. und Piasecki, D. (2001): Oxidative glutamate toxicity can be a component of the excitotoxicity cascade, *J Neurosci* 21 [19], Seite 7455-62.
- Schurr, A. (2006): Lactate: the ultimate cerebral oxidative energy substrate?, *J Cereb Blood Flow Metab* 26 [1], Seite 142-52.
- Seddik, Z.; Habib, Y. A. und el Shamy, E. (1991): The prognostic value of the brain sodium-potassium ATPase enzyme concentration in head injury, *Childs Nerv Syst* 7 [3], Seite 135-8.
- Slusher, B. S.; Vornov, J. J.; Thomas, A. G.; Hurn, P. D.; Harukuni, I.; Bhardwaj, A.; Traystman, R. J.; Robinson, M. B.; Britton, P.; Lu, X. C.; Tortella, F. C.; Wozniak, K. M.; Yudkoff, M.; Potter, B. M. und Jackson, P. F. (1999): Selective inhibition of NAALADase, which converts NAAG to glutamate, reduces ischemic brain injury, *Nat Med* 5 [12], Seite 1396-402.
- Smith, S. L.; Andrus, P. K.; Zhang, J. R. und Hall, E. D. (1994): Direct measurement of hydroxyl radicals, lipid peroxidation, and blood-brain barrier disruption following unilateral cortical impact head injury in the rat, *J Neurotrauma* 11 [4], Seite 393-404.
- Sollmann, W. P. (1997): [Craniocerebral trauma. Diagnosis, surgical and conservative therapy], *Unfallchirurg* 100 [11], Seite 895-907.

- Stibick, D. L. und Feeney, D. M. (2001): Enduring vulnerability to transient reinstatement of hemiplegia by prazosin after traumatic brain injury, *J Neurotrauma* 18 [3], Seite 303-12.
- Stoffel, M.; Plesnila, N.; Eriskat, J.; Furst, M. und Baethmann, A. (2002): Release of excitatory amino acids in the penumbra of a focal cortical necrosis, *J Neurotrauma* 19 [4], Seite 467-77.
- Stoffel, M.; Rinecker, M.; Plesnila, N.; Eriskat, J. und Baethmann, A. (2001): Role of nitric oxide in the secondary expansion of a cortical brain lesion from cold injury, *J Neurotrauma* 18 [4], Seite 425-34.
- Storck, T.; Schulte, S.; Hofmann, K. und Stoffel, W. (1992): Structure, expression, and functional analysis of a Na(+)-dependent glutamate/aspartate transporter from rat brain, *Proc Natl Acad Sci U S A* 89 [22], Seite 10955-9.
- Storm-Mathisen, J.; Danbolt, N. C.; Rothe, F.; Torp, R.; Zhang, N.; Aas, J. E.; Kanner, B. I.; Langmoen, I. und Ottersen, O. P. (1992): Ultrastructural immunocytochemical observations on the localization, metabolism and transport of glutamate in normal and ischemic brain tissue, *Prog Brain Res* 94, Seite 225-41.
- Stover, J. F.; Morganti-Kosmann, M. C.; Lenzlinger, P. M.; Stocker, R.; Kempfski, O. S. und Kossmann, T. (1999): Glutamate and taurine are increased in ventricular cerebrospinal fluid of severely brain-injured patients, *J Neurotrauma* 16 [2], Seite 135-42.
- Stover, J. F.; Sakowitz, O. W.; Beyer, T. F.; Dohse, N. K.; Kroppenstedt, S. N.; Thomale, U. W.; Schaser, K. D. und Unterberg, A. W. (2003): Effects of LY379268, a selective group II metabotropic glutamate receptor agonist on EEG activity, cortical perfusion, tissue damage, and cortical glutamate, glucose, and lactate levels in brain-injured rats, *J Neurotrauma* 20 [4], Seite 315-26.
- Stover, J. F.; Sakowitz, O. W.; Kroppenstedt, S. N.; Thomale, U. W.; Kempfski, O. S.; Flugge, G. und Unterberg, A. W. (2004): Differential effects of prolonged isoflurane anesthesia on plasma, extracellular, and CSF glutamate, neuronal activity, 125I-Mk801 NMDA receptor binding, and brain edema in traumatic brain-injured rats, *Acta Neurochir (Wien)* 146 [8], Seite 819-30.
- Stover, J. F.; Sakowitz, O. W.; Thomale, U. W.; Kroppenstedt, S. N. und Unterberg, A. W. (2002): Norepinephrine-induced hyperglycemia does not increase cortical lactate in brain-injured rats, *Intensive Care Med* 28 [10], Seite 1491-7.
- Stover, J. F. und Unterberg, A. W. (2000): Increased cerebrospinal fluid glutamate and taurine concentrations are associated with traumatic brain edema formation in rats, *Brain Res* 875 [1-2], Seite 51-5.
- Su, Z. Z.; Leszczyniecka, M.; Kang, D. C.; Sarkar, D.; Chao, W.; Volsky, D. J. und Fisher, P. B. (2003): Insights into glutamate transport regulation in human astrocytes: cloning of the promoter for excitatory amino acid transporter 2 (EAAT2), *Proc Natl Acad Sci U S A* 100 [4], Seite 1955-60.
- Sutton, R. L.; Lescaudron, L. und Stein, D. G. (1993): Unilateral cortical contusion injury in the rat: vascular disruption and temporal development of cortical necrosis, *J Neurotrauma* 10 [2], Seite 135-49.
- Teasdale, G. M.; Braakman, R.; Cohadon, F.; Dearden, M.; Iannotti, F.; Karimi, A.; Lapierre, F.; Maas, A.; Murray, G.; Ohman, J.; Persson, L.; Servadei, F.; Stocchetti, N.; Trojanowski, T. und Unterberg, A. (1997): The European Brain Injury Consortium. Nemo solus satis sapit: nobody knows enough alone, *Acta Neurochir (Wien)* 139 [9], Seite 797-803.
- Thomale, U. W.; Griebenow, M.; Mautes, A.; Beyer, T. F.; Dohse, N. K.; Stroop, R.; Sakowitz, O. W.; Unterberg, A. W. und Stover, J. F. (2007): Heterogeneous regional and temporal energetic impairment following controlled cortical impact injury in rats, *Neurol Res*.

- Thomale, U. W.; Kroppenstedt, S. N.; Beyer, T. F.; Schaser, K. D.; Unterberg, A. W. und Stover, J. F. (2002): Temporal profile of cortical perfusion and microcirculation after controlled cortical impact injury in rats, *J Neurotrauma* 19 [4], Seite 403-13.
- Troade, J. D.; Marien, M.; Darios, F.; Hartmann, A.; Ruberg, M.; Colpaert, F. und Michel, P. P. (2001): Noradrenaline provides long-term protection to dopaminergic neurons by reducing oxidative stress, *J Neurochem* 79 [1], Seite 200-10.
- Tuttle, J. L. und Falcone, J. C. (2001): Nitric oxide release during alpha1-adrenoceptor-mediated constriction of arterioles, *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 281 [2], Seite H873-81.
- Unterberg, A. W.; Sakowitz, O. W.; Sarrafzadeh, A. S.; Benndorf, G. und Lanksch, W. R. (2001): Role of bedside microdialysis in the diagnosis of cerebral vasospasm following aneurysmal subarachnoid hemorrhage, *J Neurosurg* 94 [5], Seite 740-9.
- Unterberg, A. W.; Sarrafzadeh, A. S. und Lanksch, W. R. (1999): [Skull-brain injury in polytrauma--results of neurosurgery], *Anesthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther* 34 Suppl 1, Seite S13-9.
- Vallano, M. L. (1998): Developmental aspects of NMDA receptor function, *Crit Rev Neurobiol* 12 [3], Seite 177-204.
- van den Pol, A. N.; Gao, X. B.; Patrylo, P. R.; Ghosh, P. K. und Obrietan, K. (1998): Glutamate inhibits GABA excitatory activity in developing neurons, *J Neurosci* 18 [24], Seite 10749-61.
- van Landeghem, F. K.; Schreiber, S.; Unterberg, A. W.; Von Deimling, A. und Stover, J. F. (2003): Differential concentration-dependent effects of prolonged norepinephrine infusion on intraparenchymal hemorrhage and cortical contusion in brain-injured rats, *J Neurotrauma* 20 [12], Seite 1327-37.
- van Landeghem, F. K.; Stover, J. F.; Bechmann, I.; Bruck, W.; Unterberg, A.; Buhner, C. und von Deimling, A. (2001): Early expression of glutamate transporter proteins in ramified microglia after controlled cortical impact injury in the rat, *Glia* 35 [3], Seite 167-79.
- van Landeghem, F. K.; Weiss, T.; Oehmichen, M. und von Deimling, A. (2006): Decreased expression of glutamate transporters in astrocytes after human traumatic brain injury, *J Neurotrauma* 23 [10], Seite 1518-28.
- Volterra, A.; Trotti, D.; Floridi, S. und Racagni, G. (1994): Reactive oxygen species inhibit high-affinity glutamate uptake: molecular mechanism and neuropathological implications, *Ann N Y Acad Sci* 738, Seite 153-62.
- Watase, K.; Hashimoto, K.; Kano, M.; Yamada, K.; Watanabe, M.; Inoue, Y.; Okuyama, S.; Sakagawa, T.; Ogawa, S.; Kawashima, N.; Hori, S.; Takimoto, M.; Wada, K. und Tanaka, K. (1998): Motor discoordination and increased susceptibility to cerebellar injury in GLAST mutant mice, *Eur J Neurosci* 10 [3], Seite 976-88.
- Weil-Malherbe, H.; Axelrod, J. und Tomchick, R. (1959): Blood-brain barrier for adrenaline, *Science* 129 [3357], Seite 1226-7.
- Wen, S. F.; Tremblay, J. M.; Qu, M. H. und Webster, J. G. (1988): An impedance method for blood pressure measurement in awake rats without preheating, *Hypertension* 11 [4], Seite 371-5.
- Wiesbaden, Statistisches Bundesamt (1995): Todesursachen in Deutschland. Diagnosedaten der Krankenhauspatienten, Berichtsjahre 1993-1995, Seite 4-6.2.
- Wolf, J. A.; Stys, P. K.; Lusardi, T.; Meaney, D. und Smith, D. H. (2001): Traumatic axonal injury induces calcium influx modulated by tetrodotoxin-sensitive sodium channels, *J Neurosci* 21 [6], Seite 1923-30.
- Yamamoto, T.; Rossi, S.; Stiefel, M.; Doppenberg, E.; Zauner, A.; Bullock, R. und Marmarou, A. (1999): CSF and ECF glutamate concentrations in head injured patients, *Acta Neurochir Suppl* 75, Seite 17-9.

- Young, W. (1992): Role of calcium in central nervous system injuries, *J Neurotrauma* 9 Suppl 1, Seite S9-25.
- Zhang, H.; Zhang, X.; Zhang, T. und Chen, L. (2001): Excitatory amino acids in cerebrospinal fluid of patients with acute head injuries, *Clin Chem* 47 [8], Seite 1458-62.

Danksagung

Ohne die Geduld, das Zuhören und Verständnis meiner Familie während der ganzen Zeit wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen. Vielen Dank Kathi!

Meinem Doktorvater Prof. Dr. Andreas von Deimling danke ich für die herzliche Aufnahme an seinem Institut. Sein stetes Vertrauen in ein Gelingen und die Bereitstellung aller benötigten Mittel hat die Durchführung der Experimente wesentlich erleichtert.

Ein besonderer Dank gilt Dr. Frank van Landeghem. Die offenen und vielseitigen Diskussionen haben die Arbeit wesentlich beeinflusst. Mit seinem Engagement verstand er es nicht nur, mein Interesse an der wissenschaftlichen Arbeit zu wecken, sondern die Begeisterung auch in schwierigen Zeiten zu erhalten. Seine praktische wie theoretische Anleitung legte den Grundstein für meinen wissenschaftlichen Werdegang.

Für die freundliche und engagierte Anleitung zur Durchführung der Tierexperimente möchte ich Dr. John F. Stover herzlich danken.

Für die exzellente technische Unterstützung danke ich Frau Kruppke, Frau Stichling sowie Frau Seidlitz.

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

wissenschaftliche Arbeit und Publikationen

2001 – 2008

Promotionsarbeit bei Prof. Dr. A. von Deimling
Institut für Neuropathologie, Charite – Universitätsmedizin
Berlin, Campus Virchow
Klinikum

Titel: Einfluß von Noradrenalin auf die Expression glialer Glutamatttransporter nach experimentellem Hirntrauma in der Ratte.

Neuroprotective effects of continuous norepinephrine infusion following Controlled Cortical Impact Injury are at least in part mediated by induction of glutamate transporter proteins and increased extracellular glutamate uptake

Schreiber S., Stover J.F., von Deimling A., van Landeghem F.K.
(in preparation)

Differential concentration-dependent effects of prolonged norepinephrine infusion on intraparenchymal hemorrhage and cortical contusion in brain-injured rats.

Van Landeghem FK, Schreiber S, Unterberg AW, Von Deimling A, Stover JF.
J Neurotrauma. 2003 Dec;20(12):1327-37.

Decreased hemispheric Aquaporin-4 is linked to evolving brain edema following controlled cortical impact injury in rats.

Kiening KL, van Landeghem FK, Schreiber S, Thomale UW, von Deimling A, Unterberg AW, Stover JF.

Neurosci Lett. 2002 May 17;324(2):105-8.

Eidstattliche Erklärung

„Ich, Stefan Schreiber erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: **„Neuroprotektiver Effekt durch kontinuierliche Noradrenalin Infusion und Induktion von Glutamtransportern nach experimentellem Schädel-Hirn-Trauma in 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.“

Datum

Unterschrift