

Aus der Neurochirurgischen Klinik und Poliklinik  
der Ludwig-Maximilians-Universität München  
Klinikum der Universität München – Standort Großhadern  
Direktor: Prof. Dr. J.-C. Tonn

**Mechanismen des sekundären Hirnschadens -  
Identifizierung von Pathomechanismen im Hinblick auf die  
Entwicklung translationaler Therapieansätze**

Kumulative Habilitationsschrift  
zur Erlangung der Venia Legendi der Medizinischen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München  
für das Fachgebiet Neurochirurgie

vorgelegt von

Dr. med. Nicole Angela Terpolilli

## Inhaltsverzeichnis

1. Hintergrund .....	4
2. Pathophysiologie zerebraler Insulte.....	5
2.1 Ischämischer Schlaganfall.....	5
2.2. Hämorrhagischer Schlaganfall – Subarachnoidalblutung (SAB).....	7
2.3 Schädel-Hirn-Trauma.....	8
3. Methoden.....	14
3.1 Experimentelle Modelle .....	14
3.1.1 Ischämischer Schlaganfall – MCA-Okklusions-Modell.....	14
3.1.2 Subarachnoidalblutung – MCA-Perforations-Modell.....	16
3.1.3 Schädel-Hirn-Trauma – Controlled Cortical Impact-Modell.....	17
3.2 Intravitalmikroskopie .....	18
4. Ergebnisse und Diskussion .....	20
4.1 Rolle und therapeutisches Potential des Stickstoff-Monoxid-Metabolismus nach zerebralen Insulten.....	20
4.1.1 Manuskript 1: Stickstoff-Monoxid reduziert den ischämischen Hirnschaden und verbessert das neurologische Outcome nach experimentellem ischämischen Schlaganfall durch selektive Verbesserung der Kollateraldurchblutung.....	20
4.1.2 Manuskripte 2 und 3: Stickstoff-Monoxid-Inhalation reduziert den sekundären Hirnschaden nach experimentellem Schädel-Hirn-Trauma durch Verbesserung der posttraumatischen Ischämie und verbessert somit das posttraumatische neurologische Outcome .....	24
4.1.3 Manuskript 4: Stickstoff-Monoxid-Inhalation reduziert die frühe posthämorrhagische Störung der Mikrozirkulation nach experimenteller Subarachnoidalblutung und verbessert das Outcome nach SAB.....	28
4.1.4 Manuskript 5: NO-Synthase-Inhibition reduziert den posttraumatischen Hirnschaden, insbesondere das posttraumatische Hirnödem, nach experimentellem Schädel-Hirn-Trauma.....	30
4.1.5 Manuskript 6: Die initiale Vasodilatation nach Schädel-Hirn-Trauma wird durch die endotheliale NO-Synthase vermittelt.....	32
4.1.6 Zusammenfassung und Beurteilung der Manuskripte 1 bis 6.....	33
4.2 Molekulare Mechanismen der Hirnödementstehung nach experimentellem Schädel-Hirn-Trauma als mögliches therapeutisches Target.....	36
4.2.1 Manuskript 7: Gain-of-function Mutationen im spannungsabhängigen Cav2.1. Calcium-Kanal führen zu einer massiven Steigerung des posttraumatischen Hirnödems und sind mit einem schlechten neurologischen Outcome assoziiert.....	36
4.2.2 Manuskript 8: Vasopressin 1a-Rezeptoren spielen eine wichtige Rolle bei der Entstehung des posttraumatischen Hirnödems.....	39
4.2.3 Manuskript 9: CYLD-Defizienz schützt vor oxidativer Schädigung und reduziert signifikant die posttraumatische Hirnödementstehung.....	40
4.2.4 Zusammenfassung und Beurteilung der Manuskripte 7 bis 9.....	41

4.3 Rolle von Endothelin-1a Rezeptoren für die frühe Mikrozirkulationsstörung nach Subarachnoidalblutung .....	42
4.3.1 Manuskript 10 .....	42
4.3.2 Zusammenfassung und Beurteilung der Manuskripte 4 und 10.....	44
5. Abschließende Zusammenfassung und Ausblick.....	46
6. Literaturverzeichnis.....	47
7. Links zu den Originalarbeiten .....	66
7.1 Manuskript 1 .....	66
7.2 Manuskript 2 .....	66
7.3 Manuskript 3 .....	66
7.4 Manuskript 4 .....	66
7.5 Manuskript 5 .....	67
7.6 Manuskript 6 .....	67
7.7 Manuskript 7 .....	67
7.8 Manuskript 8 .....	67
7.9 Manuskript 9 .....	67
7.10 Manuskript 10 .....	68
8. Danksagung .....	69

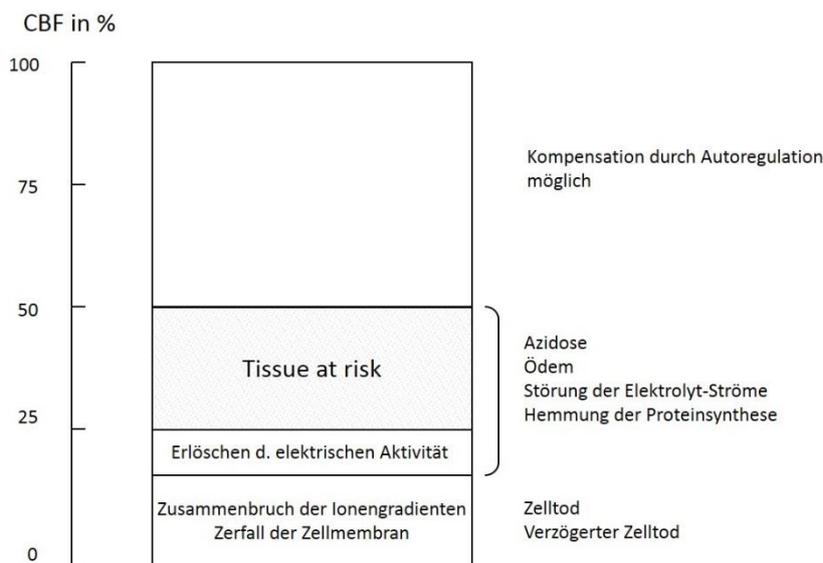
## 1. Hintergrund

Unabhängig vom auslösenden Ereignis sind Schädigungen des Gehirns mit einer hohen Mortalität und Morbidität vergesellschaftet. So ist die durch einen ischämischen oder hämorrhagischen Schlaganfall ausgelöste Mangel durchblutung (Ischämie) des Gehirns die häufigste Ursache für eine bleibende schwere körperliche Behinderung in der Bevölkerung, während das Schädel-Hirn Trauma (SHT) die häufigste Todesursache bei Kindern und jungen Erwachsenen (<45 Jahren) darstellt. Trotz unterschiedlicher Auslösemechanismen ist die Pathophysiologie der zerebralen Ischämie und des Schädel-Hirn Traumas sehr ähnlich, d.h. das Gehirn antwortet auf das schädigende Ereignis mit einer sehr stereotypen Reaktion. Der initiale Insult führt innerhalb weniger Minuten, d. h. noch bevor eine medizinische Intervention möglich ist, zum Untergang von Nervenzellen. Diese Schädigung wird als Primärschaden bezeichnet und ist auf Grund ihres schnellen Auftretens einer Therapie nicht zugänglich. Innerhalb der nächsten 24 Stunden vergrößert sich der ursprüngliche Gewebeschaden; es entwickelt sich der sogenannte sekundäre Hirnschaden. Aufgrund der verzögerten Entwicklung des Sekundärschadens ist dieser prinzipiell einer Therapie zugänglich. Um kausale Therapien des sekundären Hirnschadens zu identifizieren und mögliche Therapiestrategien auf ihre Wirksamkeit hin zu untersuchen, ist die genaue Kenntnis der zugrundeliegenden Pathomechanismen unabdingbare Voraussetzung. Ziel dieses kumulativen Habilitationsprojekts war die Pathophysiologie des sekundären Hirnschadens nach Schlaganfall und Schädel-Hirn Trauma zu untersuchen und auf Basis der daraus gewonnenen Erkenntnisse neue, translational einsetzbare Therapiekonzepte experimentell zu überprüfen.

## 2. Pathophysiologie zerebraler Insulte

### 2.1 Ischämischer Schlaganfall

Der ischämische Schlaganfall, ein durch Mangel durchblutung ausgelöster Untergang von Hirngewebe, ist weltweit die zweithäufigste Todesursache und der dritthäufigste Grund für eine bleibende körperliche Behinderung (Feigin et al., 2014; Thrift et al., 2017). Ursächlich für die Mangel durchblutung ist überwiegend ein thrombotischer oder embolischer Verschluss einer hirnversorgenden Arterie, am häufigster der A. cerebri media oder einer ihrer nachgeschalteten Äste. Da es sich bei zerebralen Gefäßen um funktionelle Endarterien mit nur sehr geringer Kollateralisierung handelt, kommt es in den entsprechenden Gefäßterritorien zu einer Ischämie, die bei Unterschreiten einer kritischen Schwelle zum neuronalen Zelltod und schließlich zu einer Pannekrose führt (Astrup et al., 1981; Siesjo, 1992a; Siesjo, 1992b).



**Abbildung 1**

Konzept der Penumbra bei zerebraler Ischämie. Modifiziert nach: Siesjö, BK., J. Neurosurgery, 1992

Im Gegensatz hierzu kommt es in einer Zone um den Infarkt-Core herum zu einer Reduktion der zerebralen Durchblutung auf kritische Werte, die zu einer Beeinträchtigung der neuronalen Funktion führen, jedoch noch nicht zur Schädigung der Zellintegrität; dieser Bereich wird Halbschatten (lat. Penumbra) oder „Tissue at risk“ genannt, da die Zellschädigung hier prinzipiell reversibel ist (**Abbildung 1**). Die CBF-Werte können durch zerebrale Autoregulation und Kollateraldurchblutung jedoch nur kurzfristig im zur Aufrechterhaltung des Strukturstoffwechsels notwendigen Bereich gehalten werden; persistiert die Ursache für die Ischämie, kommt es auch in der Penumbra zum weiteren

Durchblutungsabfall sowie sukzessive zum Absterben der Zellen (Astrup et al., 1981;Hakim, 1987;Olsen et al., 1983).

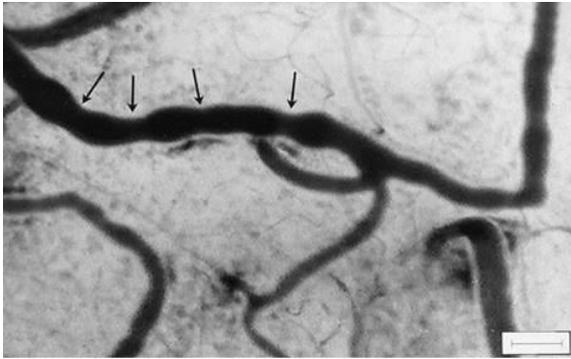
Eine wichtige Rolle für die Regulation der zerebralen Durchblutung spielt Stickstoff-Monoxid (engl. nitric oxide, NO). Dieser sehr starke körpereigene Vasodilator hat unter physiologischen Bedingungen eine wichtige Funktion bei der Aufrechterhaltung der zerebralen Ruhedurchblutung, bei der neurovaskulären Kopplung sowie der zerebralen Autoregulation (Toda et al., 2009). Produziert wird NO durch die Isoenzymgruppe der NO-Synthasen (NOS), in Endothelzellen durch die endotheliale NO-Synthase (eNOS), in neuronalen Zellen durch die neuronale NO-Synthase (nNOS). Die induzierbare NO-Synthase (iNOS) ist unter Normalbedingungen nicht nachweisbar, wird aber im Rahmen vieler Insulte aktiviert. Nach zerebraler Ischämie kommt es zu charakteristischen Veränderungen von NO-Konzentration und –produktion (Terpolilli et al., 2012): Direkt nach Beginn der Ischämie zeigt sich – nach einem initialen kurzen NO-Anstieg (Sekunden bis wenige Minuten) – eine deutliche Reduktion der zerebralen NO-Konzentration, die mehrere Tage anhält (Shibata et al., 1996) und hauptsächlich auf eine Aktivitätsabnahme sowie eine reduzierte Expression der endothelialen und neuronalen NOS zurückzuführen ist, die auch nach nur transientscher Ischämie länger anhaltend supprimiert sind (Liu et al., 2015). Wie unter physiologischen Bedingungen scheint auch bei der Ischämie und insbesondere in der ischämischen Penumbra die endotheliale Isoform der NOS eine entscheidende Rolle zu spielen: eNOS-defiziente Mäuse zeigen nach experimentellem ischämischen Schlaganfall niedrigere Durchblutungswerte und größere Infarkt volumina (Huang et al., 1996;Lo et al., 1996); hierbei konnte nachgewiesen werden, dass diese Knockout-Tiere größere Infarkt-Core-Zonen und eine kleinere Penumbra als nicht-transgene Geschwistertiere haben (Lo et al., 1996), die eNOS scheint also in diesem Zusammenhang eine wichtige Funktion bei der (passageren) Aufrechterhaltung einer ausreichenden Penumbra-perfusion beteiligt. Im weiteren Verlauf kommt es zu einer Hochregulation der unter physiologischen Bedingungen nicht aktiven induzierbaren NO-Synthase (iNOS), die nach Stunden bis Tagen zu einem Wiederanstieg der NO-Konzentration führt und die mit inflammatorischen, aber auch regenerativen Vorgängen in Zusammenhang gebracht wird (Iadecola et al., 1995b;Iadecola et al., 1996;Sehara et al., 2006). Der relative Anstieg der NO-Konzentration führt auch zur Bildung freier Sauerstoff-Radikale und hochreaktiver nitrosylierter Verbindungen, die wiederum zu inflammatorischen Reaktionen, DNA-Schädigung und Zelltod-Vorgängen führen (Forman et al., 1998;Suzuki et al., 2002;Van, V et al., 1994). Einen Beitrag zu diesen als neurotoxisch anzusehenden Vorgängen liefert zudem das Entkoppeln (engl. Uncoupling) inaktivierter eNOS- und nNOS-Moleküle: ein aktives NOS-Molekül besteht aus zwei Homodimeren, die über den essentiellen Kofaktor Tetrahydrobiopterin miteinander verbunden werden. Bei Inaktivierung lösen sich diese Dimere voneinander, was zur Bildung freier Sauerstoffradikale und letztlich zum oxidativen Schaden führt (Bever et al., 2006;Cholet et al., 1997;Landmesser et al., 2003;Pall, 2007).

## 2.2. Hämorrhagischer Schlaganfall – Subarachnoidalblutung (SAB)

Die Subarachnoidalblutung, ein Subtyp des hämorrhagischen Schlaganfalls, hat zwar eine deutlich geringere Inzidenz als der ischämische Infarkt (Alvarez et al., 2010; de Rooij et al., 2007; Ingall et al., 2000; Nieuwkamp et al., 2009; Sandvei et al., 2011; Sridharan et al., 2009; van Asch et al., 2010; van Gijn et al., 2001), betrifft jedoch ein deutlich jüngeres Patientenkollektiv (Johnston et al., 1998) und führt häufiger zu Tod (Connolly, Jr. et al., 2012; Huang et al., 2002) oder bleibender Behinderung (Hackett et al., 2000; Mayer et al., 2002). Da SAB-Patienten bei Erkrankungsbeginn häufig noch im Berufsleben stehen, stellt die SAB trotz ihrer geringen Inzidenz ein dem ischämischen Schlaganfall fast ebenbürtiges sozioökonomisches Problem dar (Dodel et al., 2010; Rivero-Arias et al., 2010).

In 80% wird die Subarachnoidalblutung durch die Ruptur eines Aneurysmas verursacht (van der Kolk et al., 2010). Nach Ruptur kommt es durch die arterielle Blutung zu einem abrupten Anstieg des intrakraniellen Drucks sowie zu einem Abfall der zerebralen Durchblutung, eine globale Durchblutungs-minderung resultiert. Das Ausmaß dieser globalen Ischämie korreliert mit der Mortalität (Bederson et al., 1995). Die Annahme, dass die globale initiale Ischämie allein vom zerebralen Perfusionsdruck (engl. cerebral perfusion pressure, CPP; d. h. der Differenz zwischen mittlerem arteriellen Blutdruck, engl. mean arterial pressure, MAP, und intrakraniell-em Druck, engl. intracranial pressure ICP) abhängt, wurde durch experimentelle (Bederson et al., 1995; Jakubowski et al., 1982) und klinische Studien (Honda et al., 2012; Schubert et al., 2009; Schubert et al., 2011) widerlegt. Diese wiesen nach, dass in der Frühphase nach SAB trotz ausreichendem Perfusionsdruck die Hirndurchblutung nachhaltig beeinträchtigt war. Zu diesem frühen Zeitpunkt (bis 72h Stunden nach Blutung) sind noch keine (angiographisch nachweisbaren) Vasospasmen der Circulus-Willisii-Gefäße vorhanden (Kassell et al., 1985; Millikan, 1975; Weir et al., 1978); diese treten erst nach mehreren Tagen auf, sodass die Ursache der frühen Durchblutungs-minderung in der Mikrozirkulation begründet sein muss. Bei Untersuchung der Gefäße der Mikrozirkulation nach experimenteller SAB zeigten sich indirekte Hinweise für eine deutliche Vasokonstriktion von Mikrogefäßen (Bederson et al., 1998; Sehba et al., 1999; Sun et al., 2009), die einige Jahre später in SAB-Patienten direkt durch in vivo Mikroskopie nachgewiesen werden konnte (Pennings et al., 2009; Uhl et al., 2003): Früh nach Blutung zeigten sich mikroarterielle Verengungen sowie charakteristische perlschnur-artige Gefäßeinengungen, die in der Folge Mikrovasospasmen (MVS, **Abbildung 2**) genannt wurden. MVS lassen sich im Tiermodell reliabel reproduzieren (Friedrich et al., 2012; Sun et al., 2009). Sie treten regelmäßig und bereits früh nach Blutung auf, bevorzugt in den kleinsten (d. h. Kapillar-) Gefäßen, und lassen sich im Mausmodell bis mindestens 72 Stunden nach Blutung nachweisen (Friedrich et al., 2012). Die Ursachen der MVS sind bisher noch unklar. Histologische (Bederson et al., 1998; Clower et al., 1994; Sehba et al., 2007) und mechanistische experimentelle Studien (Hatake et al., 1992; Sehba et al., 2011b) lassen vermuten, dass

eine der Hauptursachen eine endotheliale Dysfunktion darstellen könnte, da Gefäße der Mikrozirkulation nach SAB eine reduzierte Fähigkeit zur Vasorelaxation auf vasodilatierende Stimuli zeigen, während die Reaktion auf vasokonstriktive Stimuli erhalten bzw.



Uhl et al, Neurosurgery 2003

**Abbildung 2.** Direkte intraoperative Darstellung perlschnurartiger Mikrovasospasmen bei einem SAB-Patienten. Aus: Uhl et al, Neurosurgery, 2003

sogar verstärkt ist (Nystoriak et al., 2011;Wellman et al., 2013). Stickstoff-Monoxid, das auch im späteren Verlauf (d. h. beim verzögert auftretenden Vasospasmus) eine wichtige Rolle spielt (Pluta et al., 2005;Pluta, 2006), scheint auch an der frühen Pathologie nach SAB (engl. early brain injury, EBI) beteiligt: sofort nach Blutungsinduktion kommt es zu einem massiven Abfall der NO-Konzentration (Schwartz et al., 2000;Sehba et al., 2000;Sun et al., 2003;Yang et al., 2003), wahrscheinlich durch Inaktivierung (engl. scavenging) des NO durch Hämoglobin oder freie Sauerstoff-Radikale. Hinzu kommt, dass auch die Konzentration des Downstream-Mediators cGMP nach SAB reduziert ist (Vatter et al., 2007), zudem scheint die endotheliale NO-Synthase, die die Hauptquelle vaskulären NOs ist, in Expression und Aktivität beeinträchtigt (Sehba et al., 2004). Prinzipiell ist jedoch die Fähigkeit der zerebralen Mikrogefäße zur Dilatation auf NO erhalten (Park et al., 2001;Sehba et al., 1999), was ein therapeutisches Potential vermuten lässt.

### 2.3 Schädel-Hirn-Trauma

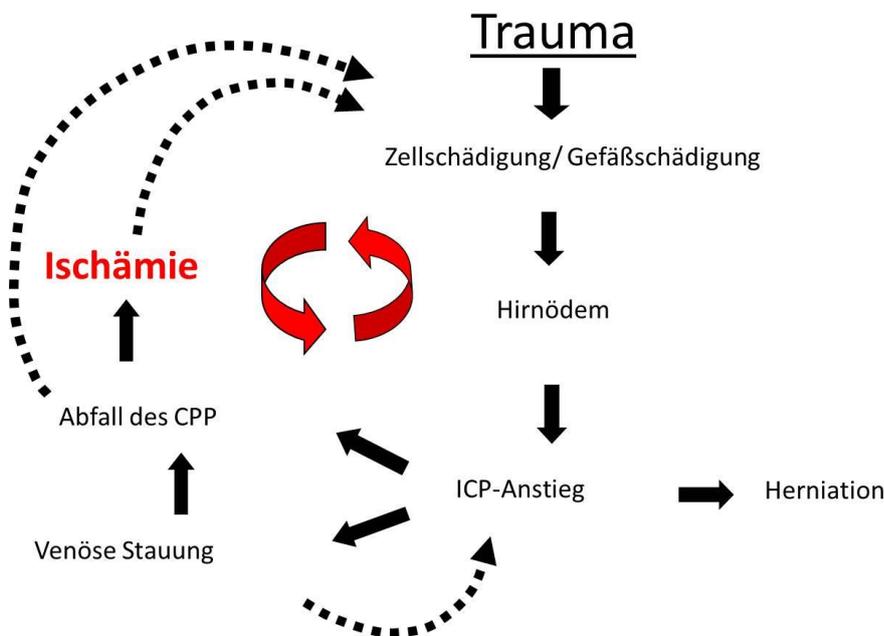
Als Schädel-Hirn-Traumata (SHT) wird eine Verletzung des Schädels mit Verletzung von Hirnparenchym, Hirnhäuten, Kalotte und den umgebenden Weichteilstrukturen genannt, die in variabler Kombination und Ausprägung vorhanden sein können. SHT (Inzidenz ca. 300 pro 100.0000 Einwohner) sind weltweit die häufigste Ursache von Tod oder bleibender Behinderung im Kindes- und jungen Erwachsenenalter dar (Barker-Collo et al., 2009); häufigster Unfallmechanismus in dieser Altersgruppe sind Verkehrsunfälle. Die WHO prognostiziert bis 2030 einen starken Anstieg von SHT-Fällen v. a. in Schwellenländern, da dort mit einer deutlichen Zunahme der Motorisierung zu rechnen ist (WHO, 2016). Bei älteren SHT-Patienten sind Stürze Hauptursache der Verletzung; da der Anteil älterer Menschen in den meisten Industrieländern zunimmt, ist auch bei diesem Patientenkollektiv in Zukunft mit einem Anstieg der SHT-Fallzahlen zu rechnen. Insgesamt starben in den letzten fünf Jahren

in Deutschland je knapp 6000 Menschen direkt an den Folgen eines Schädel-Hirn-Traumas (Statistisches Bundesamt, 2017). Die Hirnschädigung nach SHT entwickelt sich im Normalfall über einen Zeitraum von bis zu drei Tagen, typischerweise werden zwei Phasen unterschieden, der Primärschaden und die sekundäre Hirnschädigung. Als Primärschaden wird die mechanische Gewebeschädigung, die durch das Trauma selbst im Moment des Aufpralls entsteht, bezeichnet. Das Ausmaß des Primärschadens wird allein durch die physikalischen Eigenschaften der Gewalteinwirkung auf den Schädel bestimmt und kann deswegen nicht therapeutisch, sondern nur durch Präventionsmaßnahmen (z. B. Gurtpflicht, Tragen eines Helms) beeinflusst werden (Mendelow et al., 1983). Die Hauptmechanismen des primären Hirnschadens sind Blutungen (epidural, subdural, intraparenchymatös), der diffuse Axonschaden (Buki et al., 2006; Povlishock, 1986) sowie umschriebene Gewebeerletzungen, sogenannte Kontusionen. Kontusionen sind Verletzungsmuster, die häufig vorkommen, die sich bei fast 50% aller letalen SHT nachweisen lassen (Ribas et al., 1992) und die v. a. temporopolar und frontobasal, entstehen (Adams et al., 1980; Adams et al., 1983). Gewebeerletzungen können nicht nur in Nähe des Aufprallorts entstehen (als sog. Coup bezeichnet), sondern finden sich häufig - insbesondere bei peitschenschlagartigen Verletzungsmechanismen (engl. whiplash injury) - auch 180° entgegengesetzt zur initialen Traumarichtung; die so entstehenden Läsionen nennt man Contre Coup (Ommaya et al., 1971). Im Bereich der Kontusion selbst ist das Gewebe mechanisch zerstört, d. h. primär avital. Perikontusionell kommt es zu charakteristischen neurophysiologischen und biochemischen Veränderungen, die im Verlauf von Stunden bis Tagen zu einem Absterben des Gewebes um die Primärläsion führen (Zweckberger et al., 2006). Analog zum ischämischen Schlaganfall nennt man diese erst sekundär absterbende und somit potentiell durch eine Therapie zu erhaltende Gewebezone „traumatische Penumbra“. Die sekundäre Zunahme der Läsion korreliert häufig mit einer klinischen Verschlechterung des SHT-Patienten, im Maximalfall handelt es sich um Patienten, die wach und kontaktfähig in die Klinik eingeliefert werden, dann im Verlauf eintrüben und trotz Therapie versterben (engl. „patients who talk and die“)(Kim et al., 2013; Reilly et al., 1975); aber auch in milder verlaufenden Fällen lässt sich bildmorphologisch meist eine Vergrößerung der Läsion über die Zeit nachweisen, die teilweise erst nach Tagen abgeschlossen ist (Bayir et al., 2003). Die zeitliche Verzögerung, mit der die Vergrößerung des Primärschadens auftritt, ermöglicht eine potenzielle neuroprotektive Therapie, sofern die zugrundeliegenden pathophysiologischen und pathobiochemischen Mechanismen bekannt sind. Eine zentrale Rolle spielen beim sekundären Hirnschaden das posttraumatische Hirnödem und die zerebrale Ischämie. Es werden üblicherweise zwei Formen des posttraumatischen Hirnödems unterschieden, das vasogene und das zytotoxische (Baethmann et al., 1988; Klatzo, 1987; Unterberg et al., 2004), die sich im zeitlichen Verlauf überlappen und auch gleichzeitig vorherrschen können (Donkin et al., 2010). In der Frühphase nach Trauma kann es zu einer kurz andauernden Vasodilatation mit Anstieg des

intrazerebralen Blutvolumens kommen (dem sog. vascular engorgement), was den intrakraniellen Druck ansteigen lässt (Garnett et al., 2001). Zudem kommt es mechanisch bedingt oder durch eine Ischämie, die konsekutiv zu Störungen des Energiestoffwechsels mit Zusammenbruch von Ionengradienten führt, zu einer Schädigung der zerebralen Gefäße. Diese ermöglichen den Flüssigkeitsübertritt in das Interstitium und führt ebenfalls zu einer Volumensteigerung (DeWitt et al., 2003). Dieser Vorgang scheint sich vor allem an Gefäßen der Mikrozirkulation abzuspielen (Schwarzmaier et al., 2015a). Die vasogene Ödemkomponente scheint jedoch insgesamt den kleineren Teil der posttraumatischen Hirnschwellung auszumachen und ist vor allem in der Frühphase nach SHT bedeutend (Barzo et al., 1997). Als relevanter für die Prognose von SHT-Patienten wird das zytotoxische Ödem erachtet, welches durch Schwellung/ Volumenzunahme von zellulären Hirnbestandteilen bedingt ist (Marmarou et al., 2000;Marmarou et al., 2006a;Marmarou et al., 2006b) und das bis zu zwei Wochen anhalten kann (Barzo et al., 1997). Welche Ödemform zu welchem Zeitpunkt nach einem Schädel-Hirn Trauma entsteht, ist bisher nicht vollständig geklärt, beide Arten der posttraumatischen Hirnschwellung können wahrscheinlich sowohl örtlich als auch zeitlich synchron auftreten (Barzo et al., 1997;Ito et al., 1996). Für beide Ödemformen relevant ist pathophysiologisch eine Störung der Blut-Hirn-Schranke (engl. blood brain barrier, BBB). Hierbei spielen eine Reihe von Faktoren eine wichtige Rolle: unter anderem die Aktivierung des Kallikrein-Kinin-Systems, und hierbei vor allem Bradykinin bzw. Bradykinin-2-Rezeptoren (Albert-Weissenberger et al., 2013;Baethmann et al., 1988;Kunz et al., 2013;Schulz et al., 2000;Trabold et al., 2010;Zweckberger et al., 2009); die Aktivierung von Matrix-Metalloproteinasen (MMPs; insbesondere MMP-9) (Shigemori et al., 2006;Zhang et al., 2010); inflammatorische Vorgänge (Plesnila, 2016), die durch direkte Schädigung oder durch ischämie-bedingte Freisetzung von oxidativen Sauerstoff-Spezies und freien Radikalen (Abbott, 2000;Hall, 1989;Lewen et al., 2000;Pun et al., 2009) neurotoxisch wirken; Störungen der hypothalamisch-hypophysären Hormonproduktion mit gesteigerter Freisetzung von Vasopressin (Latzkovits et al., 1993;Marmarou et al., 2014;Szmydynger-Chodobska et al., 2004;Trabold et al., 2008), sowie die sogenannte Exzitotoxizität mit traumatisch oder ischämisch bedingter Freisetzung von Glutamat und konsekutivem exzessivem Einstrom von Calcium (Baethmann et al., 1989;Saito et al., 1990). Hierbei ist zu berücksichtigen, dass viele der aufgezählten Pathomechanismen sich untereinander beeinflussen und ineinander übergehen können, der Ablauf der pathophysiologischen Mechanismen der Ödementstehung also sehr komplex ist. Das akute vasogene und zytotoxische Hirnödeme führen letztlich zu einer Schwellung des Gehirns, die nach Aufbrauchen der Reserveräume in der starren Schädelkalotte zu einer Erhöhung des intrakraniellen Drucks und somit zu einer Senkung des zerebralen Perfusionsdrucks führt. Dies kann wiederum in einer Ischämie münden, die in der Folge weiteren neuronalen Zelltod verursachen kann und somit in der Folge das zytotoxische Hirnödem verstärkt. Vermehrte Ödementstehung hat einen weiteren Anstieg des

intrakraniellen Drucks und einen weiteren Abfall der zerebralen Durchblutung bis hin zur Ischämie zur Folge; insbesondere in der kritisch durchbluteten traumatischen Penumbra führt diese wiederum zum Zelltod (im Sinne eines Circulus vitiosus, siehe **Abbildung 3**).

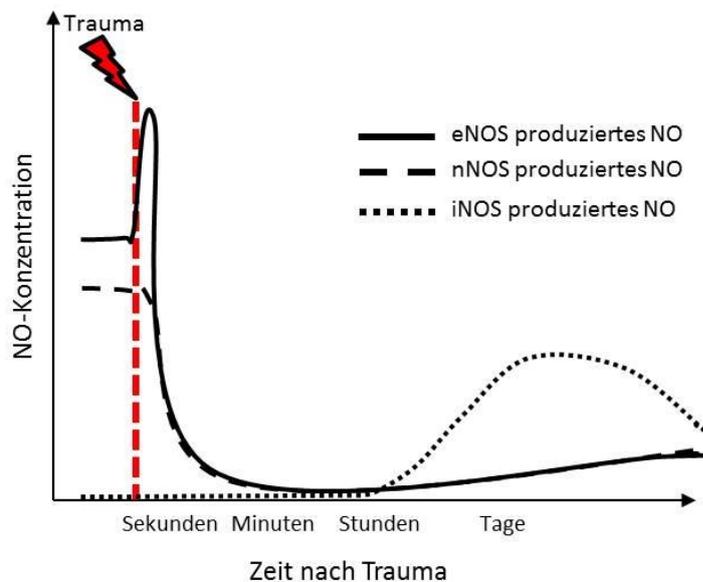
Die Ischämie nach SHT kann primär durch extrakranielle Faktoren wie systemische Hypotension oder Hypoxämie (häufig im Rahmen von Polytraumata) bedingt sein. Allerdings kann trotz ausreichendem Perfusionsdruck eine Minderdurchblutung des Gehirnparenchyms vorherrschen, einerseits wenn durch eine Steigerung des intrakraniellen Drucks (durch Blutungen oder Hirnödem, s.o.) keine ausreichende Gewebepfusion erreicht wird, andererseits kann diese auch bei niedrigem ICP durch Störungen der Mikrozirkulation eingeschränkt sein, z. B. durch Spasmen (Perrein et al., 2015), Mikrothrombosen (Schwarzmaier et al., 2010) oder durch Gefäßkonstriktionen bei Mangel an Stickstoffmonoxid (Cherian et al., 2004). Bereits kurz nach Trauma kommt es nach einem sehr kurz



**Abbildung 3.** Circulus vitiosus des sekundären posttraumatischen Hirnschadens.

andauernden NO-Peak im Moment des Traumas zu einem Abfall der NO-Konzentration und zu einer lang anhaltenden Aktivitätsabnahme der neuronalen und der endothelialen NO-Synthase (Cherian et al., 2000; Cherian et al., 2003; Cherian et al., 2004; Hlatky et al., 2002; Wada et al., 1998; Wada et al., 1999); die NOS – Dysfunktion ist um die traumatische Läsion herum (also in der traumatischen Penumbra) am deutlichsten ausgeprägt (Wada et al., 1998). NOS - Hemmung kann zudem die Gefäßpermeabilität steigern (Filep et al., 1993; Oliver, 1992), was zur Blut-Hirn-Schranken-Störung sowie zur posttraumatischen Ödembildung beitragen kann. Im weiteren Verlauf (nach Stunden bis Tagen) kommt es zu einer Expression von iNOS, weswegen die NO-Konzentration wieder ansteigt (siehe **Abbildung 4**); iNOS-produziertes NO ist in der Frühphase (erste 24-48h) nach Trauma

neurotoxisch, mit inflammatorischen Vorgängen und oxidativem Schaden vergesellschaftet und verstärkt den posttraumatischen Hirnschaden (Gahm et al., 2006; Jafarian-Tehrani et al., 2005; Louin et al., 2006). Auch das Uncoupling (siehe 2.1.1) von inaktivierten NOS-Molekülen kann neurotoxisch wirken. Das von eNOS produzierte (also vaskuläre) NO scheint den wichtigsten Anteil an der Aufrechterhaltung einer normalen Gefäßfunktion nach Trauma zu haben (Hlatky et al., 2003). Ein Anheben der NO-Konzentration nach experimentellem Trauma durch lokale Gabe des NO-Vorläufers L-Arginin verbessert die zerebrale Durchblutung und verringert die intrakranielle Hypertension (Cherian et al., 1999; Hlatky et al., 2003; Liu et al., 2002). Das direkte Aufbringen von NO-Donoren auf das Gehirnparenchym ist jedoch im klinischen Kontext nicht denkbar; die systemische Gabe von NO-Donoren wiederum senkt den systemischen Blutdruck, was trotz prinzipiell positiver Wirkung auf die Hirngefäße die zerebrale Durchblutung global verschlechtert und nach SHT zu einer Verschlechterung von Hirnschaden und neurologischer Prognose führt (Barton et al., 2005; Chesnut et al., 1993).

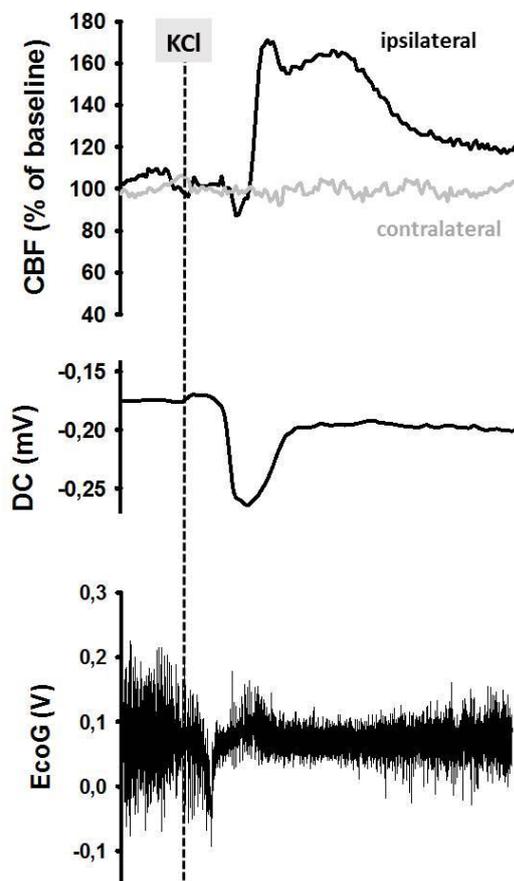


**Abbildung 4.** NO-Konzentration nach Trauma. Während es bereits kurz nach Trauma zu einer akuten NO-Depletion kommt zeigt sich im weiteren Verlauf ein durch iNOS-bedingter Anstieg der NO-Konzentration, die jedoch für mehrere Tage unter dem physiologischen Niveau bleibt.

Ein weiteres, erst seit ca. 20 Jahren im Zusammenhang mit dem SHT untersuchtes Phänomen (Strong et al., 2002), das den sekundären Hirnschaden zu beeinflussen scheint, sind sogenannte kortikale Depolarisationen. Kortikale Depolarisationswellen (engl. cortical spreading depolarisation, CSD) wurden 1944 erstmals beschrieben (Leao, 1944) und sind Zonen elektrischer Depression/Depolarisation, die sich mit langsamer Geschwindigkeit (ca. 5mm/ min) über den Kortex ausbreiten (Leao, 1944); elektrophysiologisch sind CSDs durch eine Abnahme der EEG-Amplitude und eine Negativierung des Direktstrom (DC) - Potentials charakterisiert. CSDs sind prinzipiell reversibel, führen

jedoch zu einem vorübergehenden Anstieg des Hirn-Wasser-Gehalts, der kurzfristig wieder korrigiert werden kann (Gursoy-Ozdemir et al., 2004); die Ursache dieses Phänomens ist jedoch noch nicht abschließend geklärt. Im Moment der elektrischen Depression ist die Durchblutung im CSD-Areal kurzfristig verringert, zur Rekompensation der electrophysiologischen Phänomene ist Energie in Form von gesteigerter Durchblutung notwendig (Ayata et al., 2015), sodass einer CSD unter physiologischen Bedingungen eine sich über den Kortex ausbreitende Hyperämie folgt (siehe **Abbildung 5**). Diese Hyperperfusion wird durch NOS vermittelt und bleibt bei NOS-Hemmung oder –Dysfunktion aus (Dreier et al., 1998). Nach SHT kann, wenn eine CSD im Beisein sekundärer Insulte wie einer Hypoxie oder einer gestörten neuro-vaskuläre Kopplung auftreten, die für die Rekompensation notwendige Energie bzw. Hyperämie nicht aufgebracht werden. CSDs führen dann zu einer relativen Gewebeischämie („spreading ischemia“), die zusammen mit bereits vorbestehenden Durchblutungsstörungen anderer Genese zur weiteren sekundären Schädigung des traumatisierten Gehirns beitragen kann (Trabold et al., 2006). CSDs treten nach schwerem SHT häufig

**Abbildung 5.** Multimodale Aufzeichnung einer kortikalen Depolarisationswelle (CSD), die chemisch durch Auflage



von Kalium-Chlorid (KCl) auf die Dura ausgelöst wird. Kurz nach Aufbringen von KCl (vertikale durchbrochene Linie) zeigt sich für die zerebrale Durchblutung (CBF, oberste Kurve) zunächst ein kurzer Abfall, hiernach eine länger andauernde Hyperperfusion; die Veränderung ist auf die Seite der CSD (ipsilateral, dunkelgraue Kurve) beschränkt, an der kontralateralen Durchblutung (hellgraue Kurve) gibt es keine Änderung. Das Gleichstrompotential (DC, mittlere Kurve) zeigt eine Negativierung, das Elektrokortikogramm (ECoG, oder Elektroencephalogramm, EEG) verengt gleichzeitig sich in seiner Amplitude.

auf und scheinen mit einem schweren Verlauf und einem schlechten Outcome zu korrelieren (Hartings et al., 2014; Mayevsky et al., 1996). Bisher existieren jedoch noch keine verlässlichen Daten zu den genauen Auslöse- und nachgeschalteten

Mechanismen posttraumatischer CSDs. Eine therapeutische Konsequenz konnte deswegen bisher nicht gezogen werden.

### 3. Methoden

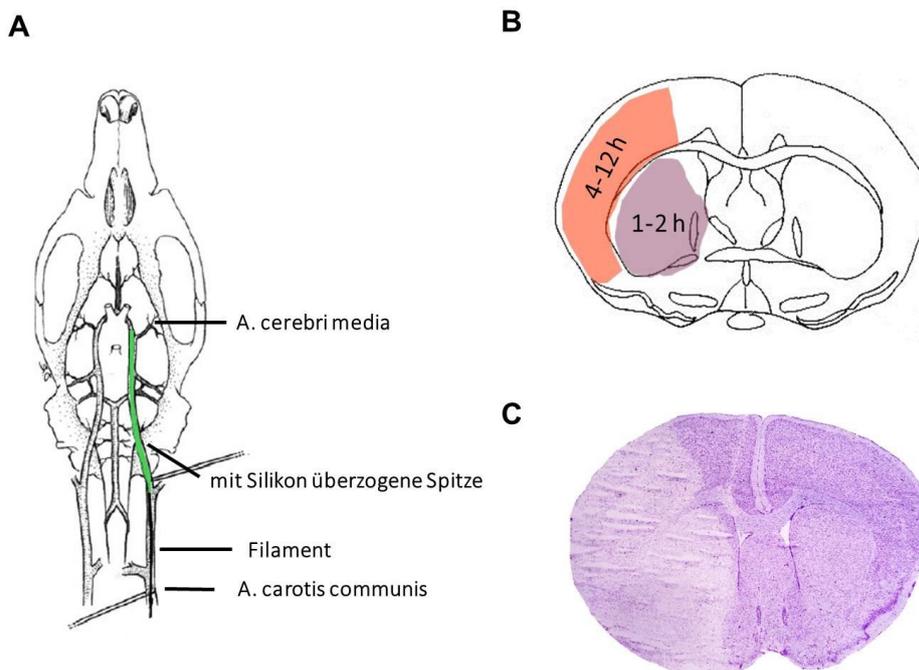
#### 3.1 Experimentelle Modelle

##### 3.1.1 Ischämischer Schlaganfall – MCA-Okklusions-Modell

Es erfolgt zunächst die Narkoseinduktion mittels subkutaner Gabe von Buprenorphin (100 mg/ kg Körpergewicht), hiernach wird eine Isofluran-Narkose über eine Marke eingeleitet (Einleitung bei 4% über 60 Sekunden, hiernach Erhaltung mit 1-1,5% Isofluran in einem 30% Sauerstoff/ 70% Luft-Gemisch). Die Verwendung von Buprenorphin hat sich in Vorstudien sowohl unserer Arbeitsgruppe als auch von anderen Gruppen (Jacobsen et al., 2013; Ratsep et al., 2013; Tubbs et al., 2011) als gut analgetisch erwiesen, ohne einen relevanten Effekt auf physiologische Parameter wie den Blutdruck, den Atemtrieb unter Maskenbeatmung, die Oxygenierung und insbesondere die Infarktentstehung nach MCA-Okklusion zu zeigen (Jacobsen et al., 2013; Yulug et al., 2007), sodass eine Beeinflussung der Versuchsergebnisse durch dieses Anästhesie-Protokoll unwahrscheinlich ist. Für Isofluran ist eine Verringerung bis Aufhebung der zerebralen Autoregulation beschrieben, zudem kann die Hirndurchblutung nachhaltig beeinflusst werden (Hoffmann et al., 2016), allerdings treten diese unerwünschten Wirkungen in Nagern erst ab höheren Konzentrationen (>2 MAC) und einer Narkosedauer von über 30 Minuten auf, was in unserem experimentellem Setup nicht erreicht bzw. überschritten wird, sodass eine massive Beeinträchtigung der Ergebnisse nicht zu erwarten ist; dies gilt auch für das experimentelle Schädel-Hirn-Trauma (siehe 3.1.3). Komplette ist diese jedoch nicht auszuschließen, allerdings ist eine ausreichende Analgesie sowohl intra- als auch perioperativ aus tierschutzrechtlichen Gründen zwingend erforderlich; zur besseren Vergleichbarkeit sind für alle Versuchsreihen Kontroll- und Sham-Gruppen mit dem gleichen Narkose-Regime vorhanden.

Die Versuchstiere werden zunächst auf dem Bauch gelagert und eine ca. 1,5 cm lange mediane Inzision der Kopfhaut durchgeführt. Nach Abschieben des Periosts wird eine fiberoptische Laser-Doppler Sonde (Perimed, Schweden) mit Akrylkleber auf die intakte Schädeldecke 2 mm kaudal und 6 mm lateral des Bregmas, über dem Versorgungsgebiet der A. cerebri media links, fixiert. Durch die permanente Messung der regionalen zerebralen Durchblutung (engl. regional cerebral blood flow, rCBF) dieses Gefäßterritoriums kann der suffiziente Verschluss der A. cerebri media (engl. middle cerebral artery, MCA) dokumentiert werden. Die Überwachung des Blutdrucks erfolgt nicht invasiv am Schwanz mit Hilfe einer Blutdruckmanschette (Kent Scientific Corporation, Torrington, USA). Hiernach wird die Maus auf den Rücken gelagert und die Haut am Hals paramedian inzidiert, der Carotis-Hauptstamm unter dem Operationsmikroskop aufgesucht und die Karotisbifurkation unter Schonung des Nervus vagus dargestellt. Die A. carotis externa wird distal der Bifurkation ligiert, die distale A. carotis interna

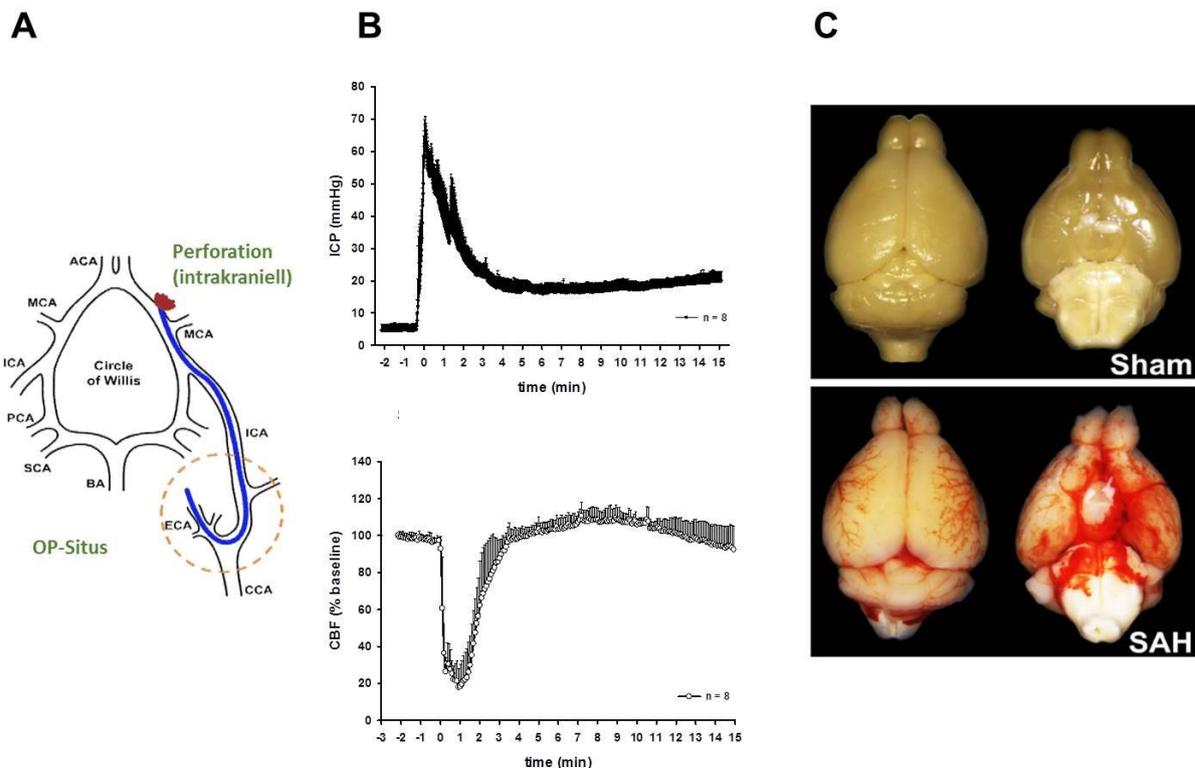
hiernach temporär geklippt. Danach wird über eine Inzision der A. carotis communis ein mit Silikon beschichteter monofiler Faden (Ethilon 5-0) in das Gefäß eingebracht und nach Lösen des Clips in die A. carotis interna vorgeschoben, bis die rCBF-Messung den Verschluss der MCA anzeigt, d. h. der gemessene Durchblutungswert unter 20% des vorab bestimmten Ausgangswerts abfällt (siehe **Abbildung 6A** für schematische Darstellung). Das Filament wird in dieser Position mit dem bereits vorgeknöteten Seidenfaden fixiert. Das Filament wird nach Erreichen der gewünschten Ischämiedauer (45 oder 60 Minuten) in erneuter kurzer Gasnarkose entfernt. Zur Schmerztherapie bei chronischen Versuchen erhielten die Tiere in den ersten drei postoperativen Tagen alle 24 Stunden eine Injektion von Carprofen (4mg/ kg Körpergewicht). Der zeitliche Verlauf der Infarktentwicklung ähnelt der humanen Pathologie: relativ rasch (1-2 Stunden) nach Induktion der Ischämie kommt es zum Gewebsuntergang im Bereich der Stammganglien (sogenannter Infarkt-Kern, engl. core), im Verlauf der nächsten 12-18 Stunden erweitert sich die Infarktzone dann bis nach kortikal (**Abbildung 6B**), da es zu einem progredienten Absterben von Parenchym in der Penumbra kommt. Die Quantifizierung des Infarktolumens erfolgt histopathologisch an koronaren, nach Nissl gefärbten Schnitten (**Abbildung 6C**), zudem kann das Hirnödem bestimmt werden (Messung nach der Feucht-Trocken-Methode). Das neurologische Outcome wird anhand repetitiv durchgeführter standardisierter Testverfahren, die motorische Fähigkeiten, Lern- und Orientierungsverhalten sowie das Fress- und Putzverhalten der Tiere bewerten, untersucht. Für Versuche mit Intravitalmikroskopie werden die Tiere durch intraperitoneale Gabe von Medetomidin (0,5 mg/ kg Körpergewicht), Midazolam (5 mg/ kg KG) und Fentanyl (0,05 mg/kg KG) narkotisiert, orotracheal intubiert und kontrolliert beatmet, vor Durchführung wird ein kraniales Fenster (siehe unten) angelegt.



**Abbildung 6.** Das MCA-Okklusionsmodell des ischämischen Schlaganfalls. A. Schematische Darstellung von Gefäßanatomie und –präparation. B. Zeitlicher und örtlicher Verlauf der Infarktstehung. C. Exemplarischer koronarer Kryoschnitt (Nissl Färbung, 12,5 fache Vergrößerung) zur Infarktbestimmung.

### 3.1.2 Subarachnoidalblutung – MCA-Perforations-Modell

Die Narkoseinduktion erfolgt durch intraperitoneale Gabe von Medetomidin (0,5 mg/ kg Körpergewicht), Midazolam (5 mg/ kg KG) und Fentanyl (0,05 mg/kg KG), worunter sich im Gegensatz zu anderen Narkoseprotokollen keine Beeinflussung der Hirndurchblutung, des intrakraniellen Drucks oder anderer für die Mikrozirkulation relevante Parameter zeigt (Thal et al., 2007). Hiernach erfolgt die orotracheale Intubation und mechanische Ventilation (Minivent 845, Hugo Sachs Elektronik, March-Hungstetten); Atemfrequenz und Atemzugvolumen wurden während des gesamten Versuchs mittels Mikrokapnometrie im expiratorischen Schenkel des Systems überprüft; um einen physiologischen Kohlenstoffdioxidpartialdruck (35-45 mmHg) zu erreichen, ist eine Atemfrequenz zwischen 120 und 160 pro Minute sowie ein Atemzugvolumen von ca. 200  $\mu$ l notwendig. Über eine rechts paramediane Längsinzision am Hals wird im Anschluss in Rückenlage die A. carotis externa (ACE) freipräpariert und an ihrem distalen Ende ligiert. Anschließend wird die ACE unmittelbar über ihrem Abgang aus der A. carotis communis (ACC) temporär geclippt und inzidiert. Über die Inzision



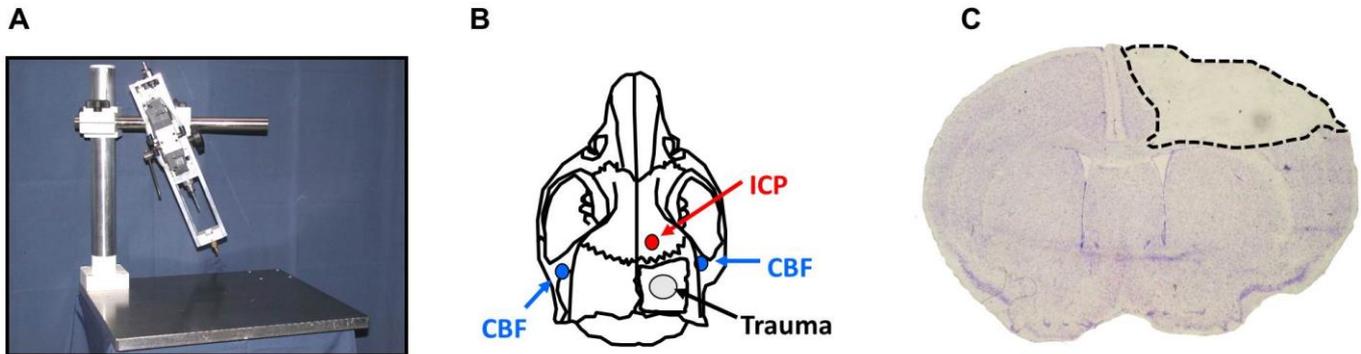
**Abbildung 7.** Das MCA-Perforationsmodell der Subarachnoidalblutung. A. Schematische Darstellung des Circulus willisii mit Perforationsort. B. Exemplarische Messkurven für den Verlauf des intrakraniellen Drucks (ICP, obere Kurve) und der zerebralen Durchblutung (CBF, untere Kurve). Makroskopische Darstellung der basal betonten SAB (SAH, unteres Foto) im Vergleich zu scheinoperierten Tieren (sham).

wird anschließend ein monofiler angeschrägter Kunststoffaden (3-0 Prolene, Ethicon, Brüssel, Belgien) nach proximal eingeführt und über die A. carotis interna (ACI) nach intrakraniell vorgeschoben. Unter kontinuierlicher Kontrolle von CBF und ICP wird der Faden vorsichtig nach intrakraniell vorgeschoben, bis er an der Bifurkation von A. cerebri media und A. communicans anterior den Circulus Willisii perforiert (siehe **Abbildung 7A** für schematische Darstellung); die erfolgreiche Auslösung der SAB wird durch einen massiven Abfall der zerebralen Durchblutung (unter 20% des Ausgangswerts) und einen raschen Anstieg des intrakraniellen Drucks angezeigt (siehe **Abbildung 7B** für exemplarische Messkurven). Der Faden wird anschließend sofort wieder in den Externastumpf zurückgezogen, die Inzision ligiert. Hiernach erfolgt der Wundverschluss mit Einzelknopfnah. Nach Antagonisierung der Anästhesie (mit Atipamezol 2,5 mg/kg KG, Flumazenil 0,5mg/ kg KG, Naloxon 1,2 mg/ kg KG) wird das Tier so lange nachbeatmet, bis wieder ausreichender Atemantrieb und Spontanmotorik vorhanden ist, um eine Extubation zu ermöglichen; hiernach werden die Tiere bis 24h nach Operation in einem auf 34°C erwärmten Inkubator gehalten, um eine Hypothermie zu vermeiden. Die MCA-Perforation führt zu einer deutlichen basalen SAB (**Abbildung 7C**). Zur Durchführung der Intravitalmikroskopie wird eine erneute Narkose und Intubation eingeleitet, hiernach das kranielle Fenster (siehe unten) präpariert.

### 3.1.3 Schädel-Hirn-Trauma – Controlled Cortical Impact-Modell

30 Minuten vor Beginn chirurgischer Maßnahmen erhalten die Tiere zur peri- und intraoperativen Analgesie eine Injektion (subkutan) von Buprenorphin. Zunächst werden die Tiere ca. 30 Sekunden lang in einer Isoflurankammer betäubt (3%), bis die Schutzreflexe erloschen sind. Die Narkose wird dann mit einem Gemisch aus 1,2% Isofluran, 30% Sauerstoff und 69% Luft, das über eine Gesichtsmaske appliziert wird, aufrechterhalten. Als Traumamodell wurde das Controlled Cortical Impact Modell (CCI) der Maus verwendet, das für verschiedene Spezies etabliert ist und eine verlässlich reproduzierbare Kontusion erzielt. Das Gerät zur CCI-Applikation (Baujahr 2000, L. Kopacz, Johannes-Gutenberg-Universität Mainz, **Abbildung 8A**) besitzt einen pressluftgetriebenen Stempel (Durchmesser 3mm), bei dem mit einer Mikrometerschraube die Eindringtiefe genau eingestellt werden kann. Die Geschwindigkeit und die Kontaktzeit überprüft ein Sensor im unteren Teil des Geräts unmittelbar vor Auftreffen des Bolzens auf die Dura. Für die Versuche wurde zunächst unter penibler Schonung der Dura mater mit einem Diamantbohrer (GD890R, Durchmesser 0,6mm, Aesculap, Tuttlingen) rechts parietal kraniotomiert, die Knochenplatte an der Medianlinie belassen und zunächst zur Mitte hin hochgeklappt (siehe **Abbildung 8B** für eine schematische Darstellung der Kraniotomie und der Platzierung der unterschiedlichen Messsonden). Hiernach wurde der CCI-Applikator genau senkrecht auf die intakte Dura mater aufgesetzt und das Trauma mit einer Eindringtiefe von 1mm, einer Geschwindigkeit von 8 m/s und einer Kontaktzeit von 150 ms appliziert. Direkt nach Auslösung des

Traumas wurde die Kraniotomie mit Gewebekleber (vetbond, 3TM Animal care products, St. Paul, MN, USA) verschlossen. Hiernach erfolgte der Wundverschluss mit Einzelknopf-Naht mit monofilem



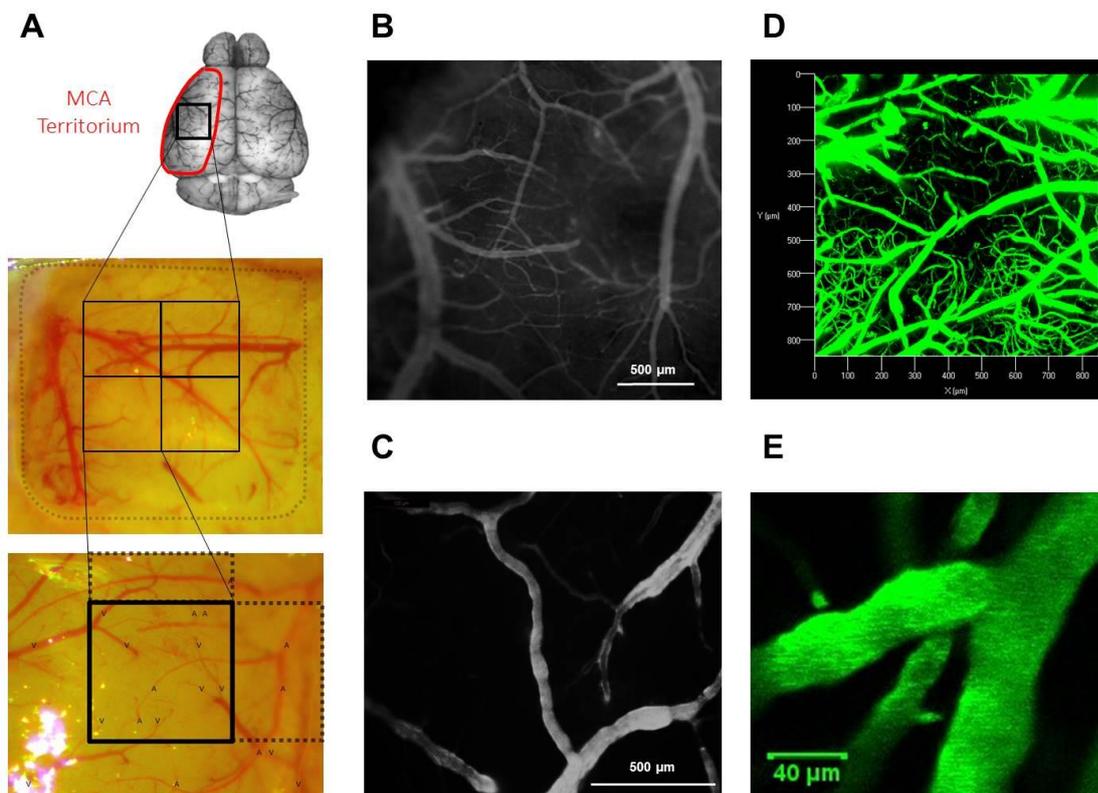
**Abbildung 8.** Das CCI-Modell des Schädel-Hirn-Traumas. A. CCI-Maschine. B. Schematische Darstellung der Kalotte mit Anbringung der unterschiedlichen Sonden zur Messung des intrakraniellen Drucks, der zerebralen Durchblutung in Relation zur rechts parietalen Kraniotomie. C. Koronarer Nissl-Schnitt 24h nach CCI.

Nahtmaterial (Ethibond Excel 5/0, Ethicon, Brüssel, Belgien). Zur Schmerztherapie bei chronischen Versuchen erhielten die Tiere in den ersten drei postoperativen Tagen alle 8 Stunden eine Injektion von Buprenorphin (100mg/kg Körpergewicht). Das CCI-Modell führt zu einer gut standardisierbaren und reproduzierbaren Kontusion, die histologisch zu unterschiedlichen Zeitpunkten mittels Histomorphometrie an seriellen koronaren Schnitten bestimmt werden kann (**Abbildung 8C** zeigt ein Beispiel 24 h nach CCI).

### 3.2 Intravitalmikroskopie

Zur direkten Visualisierung der zerebralen Mikrozirkulation wird ein kraniales Fenster angelegt, welches mit einem Diamant-Bohrer unter Schonung der Dura mater präpariert wird. Dieses wird für das SAB- und das Ischämie-Modell links parietal über dem Media-Stromgebiet angelegt (**Abbildung 9A**), für das CCI-Modell anterior zur CCI-Trepanation rechts parietal. Das Versuchstier wird in einer stereotaktischen Halterung hiernach unter dem Mikroskop platziert; der OP-Tisch ist mit einem computergesteuerten Mikromanipulator verbunden, der das millimetergenaue Manövrieren und Positionierung unter dem Mikroskop erlaubt und somit ermöglicht, die zu untersuchenden Regionen innerhalb des kranialen Fensters repetitiv mit hoher Genauigkeit anzusteuern. Zur direkten Visualisierung der Gefäße wird ein Plasmamarker (Fluorescein-Isothiocyanate-Dextran, FITC Dextran, Merck, Darmstadt; 70 kD, Exzitations-Maximum 490 nm, Emissions Maximum 520 nm) intravenös als Bolus appliziert. Zu Beginn des Habilitationsprojekts wurde zur Intravitalmikroskopie ein mit einer

Kamera verbundenes Auflicht-Fluoreszenz-Mikroskop (MST 49, Leica, Wetzlar) zur Visualisierung der pialen Gefäße verwendet, mit dem Gefäße der obersten 30-50  $\mu\text{m}$  der Hirnoberfläche dargestellt werden können (**Abbildung 9B, C**). Ab 2014 stand ein 2-Photonen-Mikroskop (2-PM, Zeiss LSM-7 MP, Oberkochen, mit Li:Ti-Laser, Chameleon, Coherent, USA) zur Verfügung; diese neue Technik erlaubt eine deutlich höhere Eindringtiefe in das Gewebe (bis 1000  $\mu\text{m}$ ) bei verringerter Phototoxizität (Helmchen et al., 2005; Rubart, 2004), hierdurch wird die Darstellung der Mikrozirkulation bis in eine Tiefe von ca. 700  $\mu\text{m}$  und somit die dreidimensionale Darstellung der zerebralen Gefäßnetzwerke in hoher Vergrößerung ermöglicht (**Abbildung 9D, E**). Das Bildmaterial wurde digital aufgezeichnet und offline mittels Bildbearbeitungsprogrammen analysiert und ausgewertet. Bewertet werden unter anderem die Gefäßweite von arteriellen und venösen Gefäßen unterschiedlicher Durchmesser, Vorhandensein und Anzahl von zerebralen Mikrovasospasmen (Friedrich et al., 2012) sowie die Dichte des Kapillarnetzwerkes.



**Abbildung 9.** Die Intravital-Mikroskopie. A. Lokalisation des kranialen Fensters (MCA Okklusions- und -Perforationsmodell). B. Darstellung der zerebralen Zirkulation nach FITC-Gabe mittels der Epifluoreszenz-Mikroskopie in Übersichtsvergrößerung und in größerer Vergrößerung (C.) mit Nachweis von perlschnurartigen Mikrovasospasmen 3h nach experimenteller SAB. Die 2-Photonen-Mikroskopie (D: Übersichtsvergrößerung, E: Detail) bietet eine deutlich bessere Auflösung und ermöglicht das Mikroskopieren in eine Tiefe bis über 500  $\mu\text{m}$  mit der Möglichkeit der Herstellung eines 3D-Datensatzes.

## 4. Ergebnisse und Diskussion

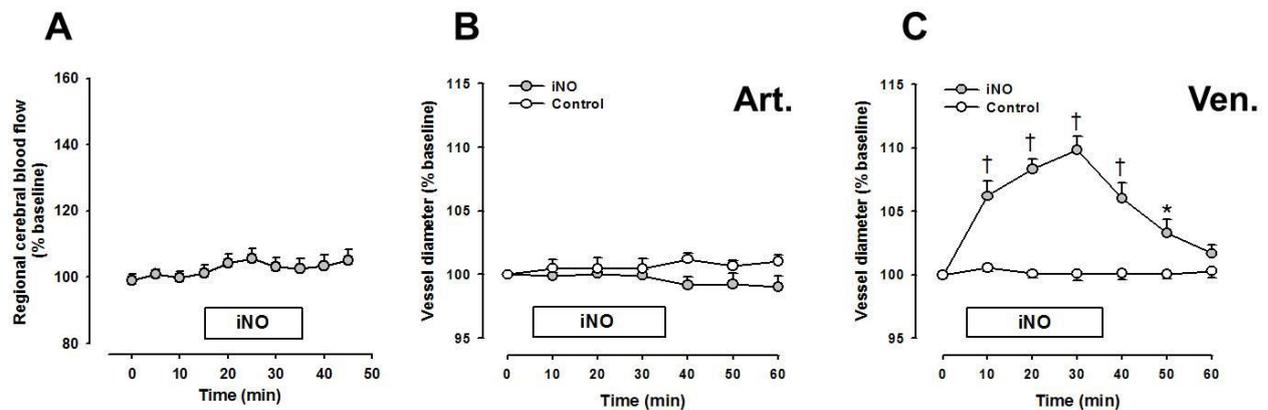
### 4.1 Rolle und therapeutisches Potential des Stickstoff-Monoxid-Metabolismus nach zerebralen Insulten

#### 4.1.1 Manuskript 1: Stickstoff-Monoxid reduziert den ischämischen Hirnschaden und verbessert das neurologische Outcome nach experimentellem ischämischen Schlaganfall durch selektive Verbesserung der Kollateraldurchblutung

Wie oben beschrieben besteht bereits kurz nach Beginn der zerebralen Ischämie ein lokaler Mangel an endogen produziertem Stickstoffmonoxid in der zerebralen Zirkulation. In experimentellen Studien konnte gezeigt werden, dass die externe Supplementierung von NO (durch Gabe des NO-Vorläufers L-Arginin oder NO-Donoren (Greco et al., 2007; Morikawa et al., 1992; Morikawa et al., 1994)) die zerebrale Durchblutung nach ischämischem Schlaganfall verbessern und somit den postischämischen Hirnschaden senken kann. Diese vielversprechenden Ergebnisse konnten bisher noch nicht erfolgreich auf die Therapie von Patienten übertragen werden, da die systemische Gabe dieser Substanzen nicht nur einen dilatierenden Effekt auf zerebrale Gefäße ausübt, sondern zu einer systemischen Vasodilatation mit konsekutiver systemischer Hypotension führt (Thadani et al., 2006), die den zerebralen Perfusionsdruck und somit die Hirndurchblutung senkt und somit letztlich keinen positiven Effekt auf das neurologische Outcome zeigt; deswegen sind laut der aktuellsten Metaanalyse aus 2017 NO-Donoren bzw. L-Arginin-Analoga nicht zur Therapie des Schlaganfalls empfohlen (Bath et al., 2017). Eine weitere Applikationsart für NO ist die inhalative Gabe (inhalatives NO, iNO). Diese Therapieform wurde in den 1990er Jahren entwickelt zur Behandlung von Lungenerkrankungen mit pulmonaler Vasokonstriktion (Dupuy et al., 1992; Fratacci et al., 1991; Frostell et al., 1991; Frostell et al., 1993). Es konnte gezeigt werden, dass iNO schnell und potent arterielle Lungengefäße dilatiert und somit u. a. effektiv pulmonalen Hypertonus beim Neugeborenen oder Erwachsenen reduziert. Als Haupt-Vorteil gegenüber anderen NO-basierten Therapieformen bot die NO-Inhalation keine offensichtlichen Nebenwirkungen, insbesondere keine Beeinflussung der systemischen Zirkulation, iNO zeigte keinen Effekt auf den arteriellen Blutdruck oder die Perfusion anderer (extrapulmonaler) Organe. Initial wurde deswegen postuliert dass das eingeatmete NO in der Lunge sofort mit Oxy-Hämoglobin reagiert und hierdurch inaktiviert wird (Fratacci et al., 1991; Frostell et al., 1993; Hillman et al., 1997; Krasuski et al., 2000; Pepke-Zaba et al., 1991; Rimar et al., 1993). Als sich nach einigen Jahren die (experimentellen) Hinweise mehrten, dass sich doch iNO-Wirkungen in peripheren Gefäßbetten außerhalb der Lunge nachweisen ließen (Fox-Robichaud et al., 1998; Neye et al., 2012; Nishida et al., 1994), erfolgte auch die genauere Untersuchung einer möglichen iNO-Wirkung in der zerebralen Zirkulation; es konnte jedoch während der Anwendung von iNO bei pulmonalen Problematiken kein Einfluss auf die zerebrale Durchblutung nachgewiesen werden (Kuebler et al., 2003; Meurs et al., 1997); eine Studie wies zwar

eine Steigerung des intrazerebralen Blutvolumens (engl. cerebral blood volume, CBV) unter iNO nach (Kuebler et al., 2003), die jedoch nicht erklärt werden konnte.

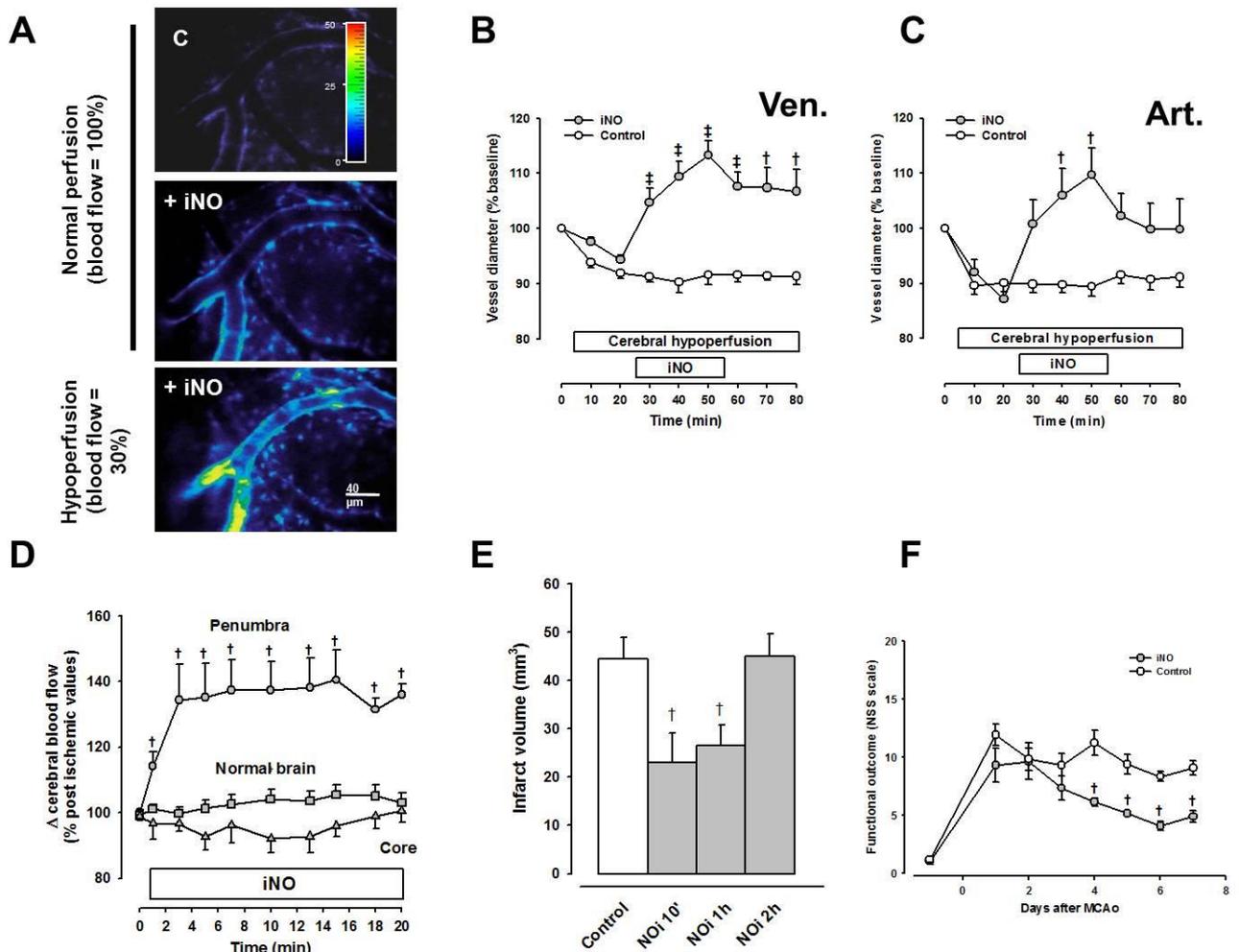
In der vorliegenden Arbeit konnte erstmalig gezeigt werden, dass es durch die NO-Inhalation zu einer selektiven Zunahme der Durchblutung in minderperfundierten bzw. ischämischen Hirnarealen kommt. Wir verwendeten eine Dosierung von 50 parts per million (ppm), was einer mittleren (Erwachsenentherapie) bis höheren Dosis (Neugeborenentherapie) entspricht. Unter physiologischen Bedingungen führt die NO-Inhalation zu keiner Änderung der zerebralen Durchblutung (**Abbildung 10A**) und - wie aufgrund des CBF-Befundes zu erwarten – zu keiner Änderung des Durchmesser zerebraler Arteriolen (**Abbildung 10B**); es ist jedoch unter iNO eine selektive Dilatation zerebraler Venen nachweisbar (**Abbildung 10C**). Die NO-Freisetzung scheint also nach Inhalation an einen Sauerstoff-Partialdruck-abhängigen Mechanismus gekoppelt zu sein, der eine Freisetzung des NO in Gefäßen mit niedriger Oxygenierung (unter physiologischen Bedingungen also im venösen Stromgebiet) begünstigt. Wird eine zerebrale Minderdurchblutung induziert (durch Drosselung der Durchblutung der Karotiden auf 30% des Ausgangswerts), sinkt der Grad der Oxygenierung bereits im arteriellen Schenkel der Mikrozirkulation. Wird unter diesen Bedingungen die NO-Inhalation angewendet, findet die NO-Freisetzung bereits bei Arteriolen statt, was sich direkt mit einem NO-sensitiven Farbstoff nachweisen lässt: es kommt es zu einem deutlich stärkeren Anstieg der NO-Konzentration in der Wand der Arteriolen (**Abbildung 11A**); auf die Gefäßweite bezogen zeigt sich



**Abbildung 10.** Effekt der NO-Inhalation unter physiologischen Bedingungen. A. iNO führt zu keiner Veränderung der zerebralen Durchblutung, da der Durchmesser zerebraler Arteriolen (B) unbeeinflusst bleibt. Allerdings zeigt sich eine signifikante venöse Vasodilatation (C).

wie unter Normalbedingungen eine Dilatation von venösen Gefäßen (**Abbildung 11B**); unter hypoxischen Bedingungen führt iNO aber nun auch in arteriellen Gefäßen zur Vasodilatation (**Abbildung 11C**), während sich in normal durchbluteten Gehirnarealen kein Effekt zeigt (d. h. in

Arealen, in welchen die arteriellen Gefäße keine Hypoxie aufweisen und wo folglich NO nicht im arteriellen Schenkel freigesetzt wird). Wird die NO-Inhalation nach MCA-Okklusion angewendet zeigt sich eine selektive Durchblutungssteigerung in der (hypoxischen) Penumbra (**Abbildung 11D**); im Infarkt-Core, wo die Durchblutung sistiert hat (und wohin das NO also nicht transportiert werden kann), ist ebenso wenig ein Effekt nachweisbar wie im normal perfundierten Gewebe außerhalb des Ischämie-Territoriums oder kontralateral („normal brain“). Diese selektive Durchblutungssteigerung führt zu einer signifikanten Reduktion der Infarktgröße (**Abbildung 11E**) und zu einer Verbesserung der neurologischen Funktion nach zerebraler Ischämie in erwachsenen (**Abbildung 11F**) und neonatalen Mäusen, die auch 7 Tage nach Beendigung der Therapie noch nachweisbar ist. Das hohe translationale Potential dieses Therapieansatzes wird durch Bestätigung der Kleintier-Ergebnisse in

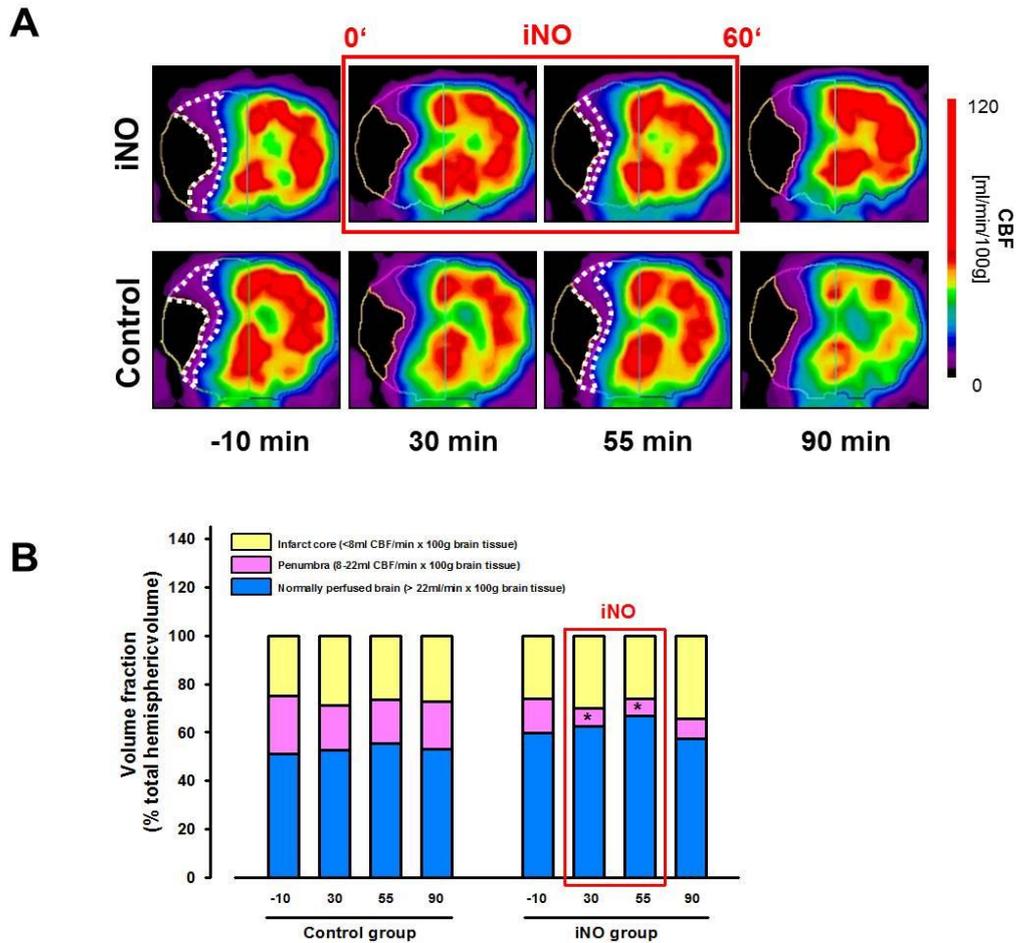


**Abbildung 11.** Effekt der NO-Inhalation nach zerebraler Ischämie. A. Direkte in vivo Visualisierung der NO-Konzentration in der Gefäßwand mittels des NO-sensitiven Farbstoffs DAF-FM. Unter Normalbedingungen zeigt

sich nur eine geringe NO-Fluoreszenz, die sich durch iNO (mittleres Panel) gering erhöht; wird jedoch eine Minderperfusion ausgelöst (unteres Panel) zeigt sich ein signifikanter Anstieg der NO-Konzentration in den ischämischen Gebieten. Unter diesen Bedingungen zeigt sich nicht nur die bekannte venöse Vasodilatation (B), sondern es lässt sich auch eine arterielle Vasodilatation nachweisen (C). D. Nach MCA-Okklusion zeigt sich eine signifikante Steigerung der zerebralen Durchblutung spezifisch in minderperfundierten Arealen: Während in der Penumbra der CBF signifikant ansteigt, ist die Durchblutung im normalen Gehirn und im Infarkt Core unbeeinflusst. Dies führt zu einer signifikanten Reduktion des Infarktvolumens (E) und einem verbesserten neurologischen Outcome (F).

einem Großtier- Modell unterstrichen (**Abbildung 12**): Bei Schafen wird mittels seriellen MRT- und H<sub>3</sub>O-PETs direkt nachgewiesen, dass es nach MCA-Infarkt bei iNO-behandelten Tieren selektiv zu einer Verbesserung der Durchblutung in der Penumbra kommt, wodurch der Anteil normal perfundierten Gehirngewebes im Vergleich zu unbehandelten Kontrolltieren ansteigt.

Die Studie belegt somit erstmalig direkt eine iNO-spezifische Wirkung auf zerebrale Gefäße, die bisher nur indirekt vermutet wurde (Kuebler et al., 2003); die Besonderheit ist, dass die NO-Freisetzung bevorzugt in minderperfundierten Arealen stattfindet und somit selektiv dort zu einer Durchblutungssteigerung führt. Im Gegensatz zur Gabe von NO-Vorläufern oder NO-Donoren, die zwar experimentell den postischämischen Hirnschaden senken konnten, zeigten sich durch iNO in der vorliegenden Studie keine potentiell neurotoxischen Nebenwirkungen im Nager- und Großtier-Modell, die selektive Wirkung der NO-Inhalation in ischämischen Hirnarealen ohne Beeinflussung normal perfundierter Abschnitte der Mikrozirkulation lassen iNO als einen idealen Vasodilator für die



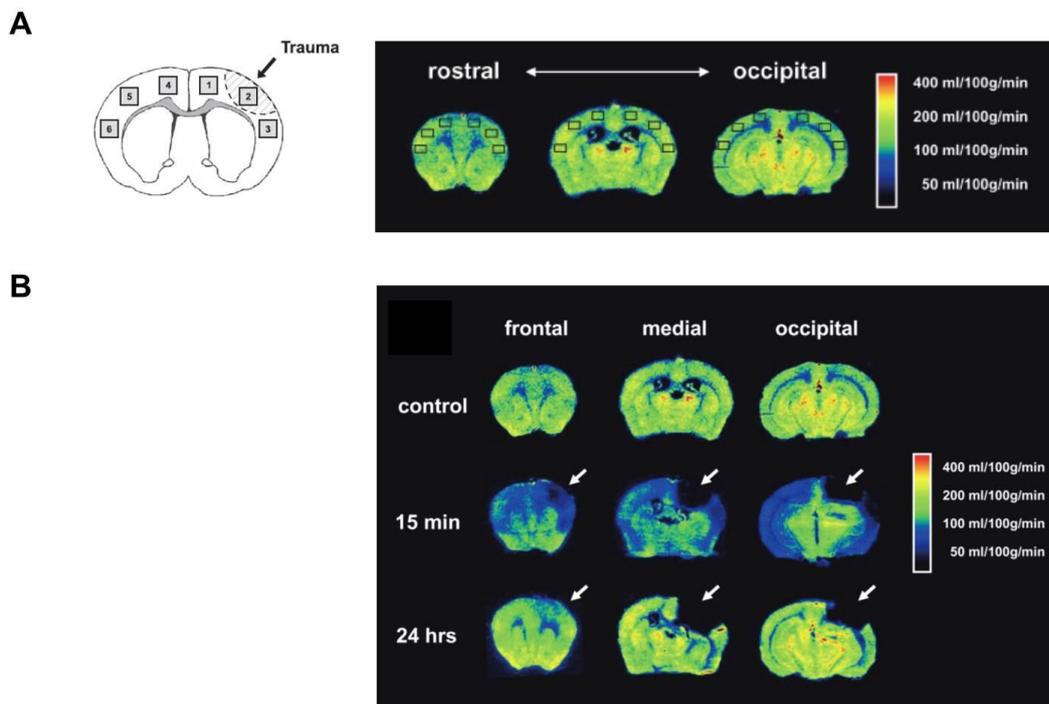
**Abbildung 12:** Effekt der NO-Inhalation im Schaf-Modell des ischämischen Infarkts. A. Serielle PET Scans vor, unter und nach iNO. B. Quantifizierung. Unter iNO nimmt die Penumbra (rosa) zu Gunsten normal perfundierten Hirngewebes (blau) ab.

zerebrale Ischämie erscheinen. Zudem ist die NO-Inhalation zur klinischen Therapie zugelassen, sodass eine erfolgreiche Translation auf die humane Pathologie möglich erscheint. Außerdem unterstreichen die Ergebnisse die entscheidende Rolle der NO-Depletion für die pathophysiologischen Vorgänge in der Penumbra, da die selektive Zuführung von NO das progressive Absterben der Penumbra und somit das Fortschreiten der Infarktentwicklung entscheidend verbessern.

4.1.2 Manuskripte 2 und 3: Stickstoff-Monoxid-Inhalation reduziert den sekundären Hirnschaden nach experimentellem Schädel-Hirn-Trauma durch Verbesserung der posttraumatischen Ischämie und verbessert somit das posttraumatische neurologische Outcome

Die zerebrale Ischämie spielt eine wichtige Rolle bei der Pathophysiologie des Schädel-Hirn-Traumas. Für das das weit verbreitete Controlled Cortical Impact Modell der Maus konnte in einer von der

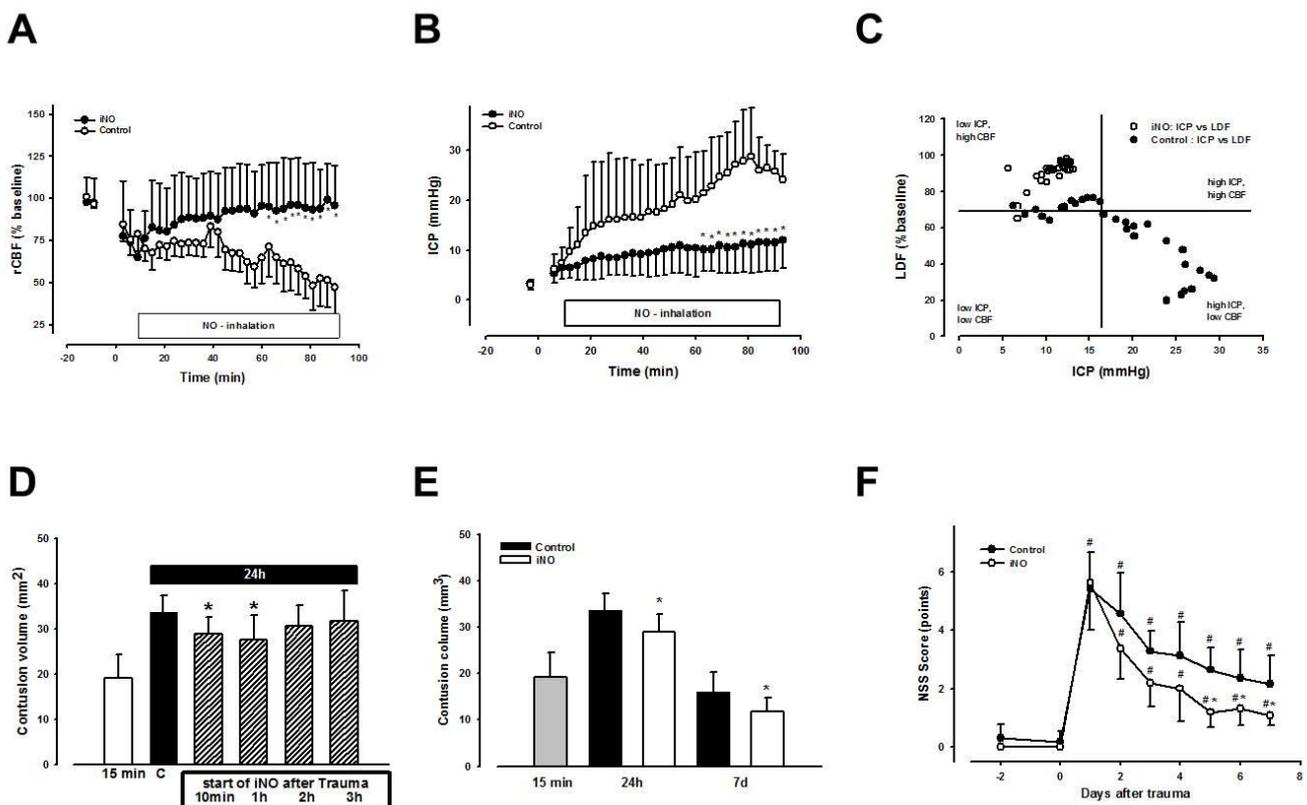
Antragstellerin als Koautorin publizierten Arbeit (Manuskript 2) der genaue Verlauf und das räumliche Verteilungsmuster der Ischämie nach experimentellem Trauma genau beschrieben werden. Hierzu kam die  $C^{14}$ -Autoradiographie, eine Radionuklid-basierte Methode zur absoluten Quantifizierung der zerebralen Durchblutung, zum Einsatz. Die Werte, die hierbei im Kortex vor und nach Trauma erhoben wurden, waren niedriger als von anderen Gruppen erhobene Befunde, im Gegensatz zu vielen vorangegangenen Studien waren die Versuchstiere jedoch intubiert und kontrolliert beatmet; eine systemische Hypoxie, wie sie nach Trauma bei Maskenbeatmung aufgrund reduzierten Atemantriebs bei Maskenbeatmung auftreten kann und die die zerebrale Durchblutung relevant beeinflussen kann, ist somit ausgeschlossen. Zudem erfolgte die Narkoseführung mit einer Kombination aus Fentanyl, Medetomidin und Midazolam, ein Narkoseprotokoll, das im Gegensatz zu in anderen Studien verwendeten Isofluran zu keiner Beeinflussung der zerebralen Durchblutung führt. Bereits kurz nach Trauma kommt es zu einem signifikanten Abfall der zerebralen Durchblutung in allen untersuchten Hirnarealen um ca. 50%; um die Kontusion - den Primärschaden - herum zeigen sich die Werte besonders reduziert, um mehr als 90% gegenüber dem Ausgangswert gefallen (**Abbildung 13**). 24 Stunden nach CCI waren die CBF-Werte weitestgehend normalisiert, ausgenommen im Bereich der Kontusion, die sich im Rahmen des sekundären Nekrosewachstums vergrößert hatte. Dies deutet darauf hin, dass in der traumatischen Penumbra, der Zone deutlich reduzierter Durchblutung perikontusionell, die frühe Ischämie eine wichtige Rolle spielt, höchstwahrscheinlich, indem dort durch die Hypoperfusion sekundäre Vorgänge induziert werden, diese führen dann in der Folge trotz



**Abbildung 13.** Zeitlicher und räumlicher Verlauf der posttraumatischen Durchblutungsstörung nach CCI. A, Schematische Darstellung der untersuchten Hirnregionen nach  $C^{14}$ -Autoradiographie. B. Bereits 15 Minuten

nach CCI zeigt sich eine ausgeprägte Hypoperfusion, die nicht nur auf die traumatisierte Hemisphäre beschränkt ist. Der CBF erholt sich jedoch im Verlauf der nächsten 24h in nahezu allen ROIs auf Normalwerte.

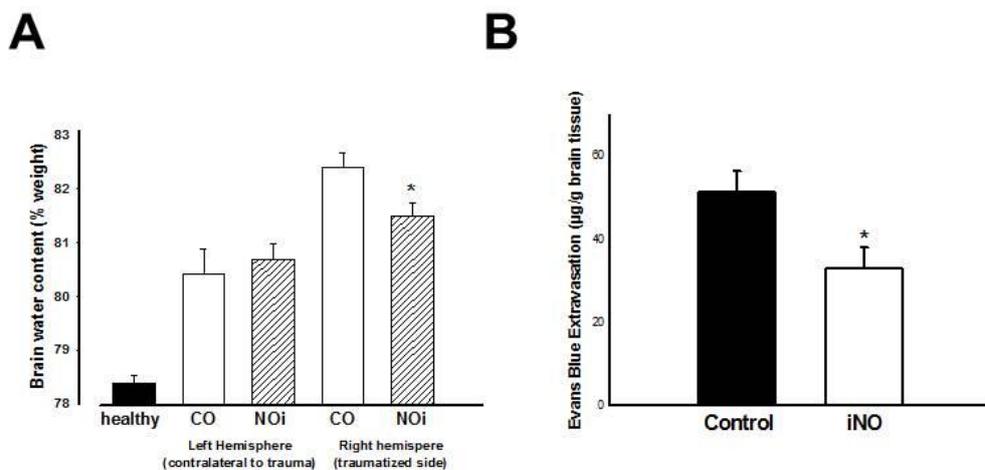
Normalisierung der Durchblutung zum Gewebsuntergang. Analog zum ischämischen Schlaganfall spricht man von der „traumatischen Penumbra“. Für diese perikontusionelle Ischämie scheint eine lokale NO-Depletion eine wichtige Rolle zu spielen, die u. a. durch die Minderperfusion sowie die Aktivitätsminderung/ reduzierte Expression der konstitutiven NO-Synthasen bedingt ist (Kader et al., 1993). In einer nachfolgenden Studie (Manuskript 3) überprüften wir deswegen, ob auch beim posttraumatischen Hirnschaden die selektive Durchblutungsverbesserung bzw. die selektive NO-Gabe zur Auffüllung eines lokalen NO-Defizits durch die NO-Inhalation neuroprotektiv ist. Die Gabe von iNO verhinderte die direkt nach dem Trauma auftretende Durchblutungsreduktion und verringerte signifikant den Anstieg des intrakraniellen Drucks (**Abbildung 14A, B, C**). Wenn die NO-Inhalation innerhalb einer Stunde nach CCI begonnen und für 24 Stunden durchgeführt wurde, verringerte iNO signifikant das Nekrosevolumen (**Abbildung 14D**), eine spätere Gabe, eine kürzere Gabe bzw. eine intermittierende Gabe von iNO verringerte den posttraumatischen Hirnschaden nur leicht. Relevante Nebenwirkungen der prolongierten iNO-Gabe fanden sich für die verwendete Dosis 50 ppm jedoch nicht, es zeigten sich keine Auswirkungen der 24h iNO Gabe auf die Autoregulation, die endogene NOS-Expression; zudem konnten oxidative Gewebeschädigung, Met-Hämoglobin-Bildung sowie ein negativer Einfluss auf den systemischen Blutdruck ausgeschlossen werden.



**Abbildung 14.** NO-Inhalation nach experimentellem SHT. iNO verringerte signifikant den posttraumatischen Durchblutungsabfall (A) sowie (B) die intrakranielle Hypertension, sodass die Mehrzahl der gemessenen ICP/CBF-Paare sich in der für die Prognose günstigen „high CBF, low ICP“-Kategorie (rechter unterer Quadrant, C) befanden. D. Der posttraumatische Hirnschaden ist signifikant reduziert, wenn die iNO-Therapie innerhalb von einer Stunde begonnen wird; diese Neuroprotektion lässt sich auch bis 7 Tage nach CCI und 6 Tage nach Ende der iNO Therapie nachweisen (E). F. Das neurologische Outcome ist nach iNO nachhaltig gebessert.

Die Reduktion des Kontusionsvolumens durch 24h iNO führte auch längerfristig (bis 7 Tage nach SHT) zu einem verringerten strukturellen Hirnschaden (**Abbildung 14E**), zudem zeigten die Tiere ein verbessertes neurologisches Outcome in einem multivariaten Neuroscore (**Abbildung 14F**).

Wie in Manuskript 2 herausgearbeitet ist beim SHT wahrscheinlich nicht allein die Ischämie ausschlaggebend für das sekundäre Nekrosewachstum. Über die durchblutungsverbessernde Wirkung herausgehend zeigte sich in der vorliegenden Studie, dass beim experimentellen Trauma nach iNO-Gabe die Hirnödementstehung signifikant reduziert war. Hierbei war einerseits der Hirn-



**Abbildung 15.** Effekt der NO-Inhalation auf Ödementstehung und Blut-Hirn-Schranken-Störung. iNO reduziert A. den posttraumatischen Hirnwassergehalt, der ein Maß für das Hirnödem ist sowie die Evans Blue Extravasation (B), was eine verringerte Dysfunktion bzw. Leckage der BBB anzeigt.

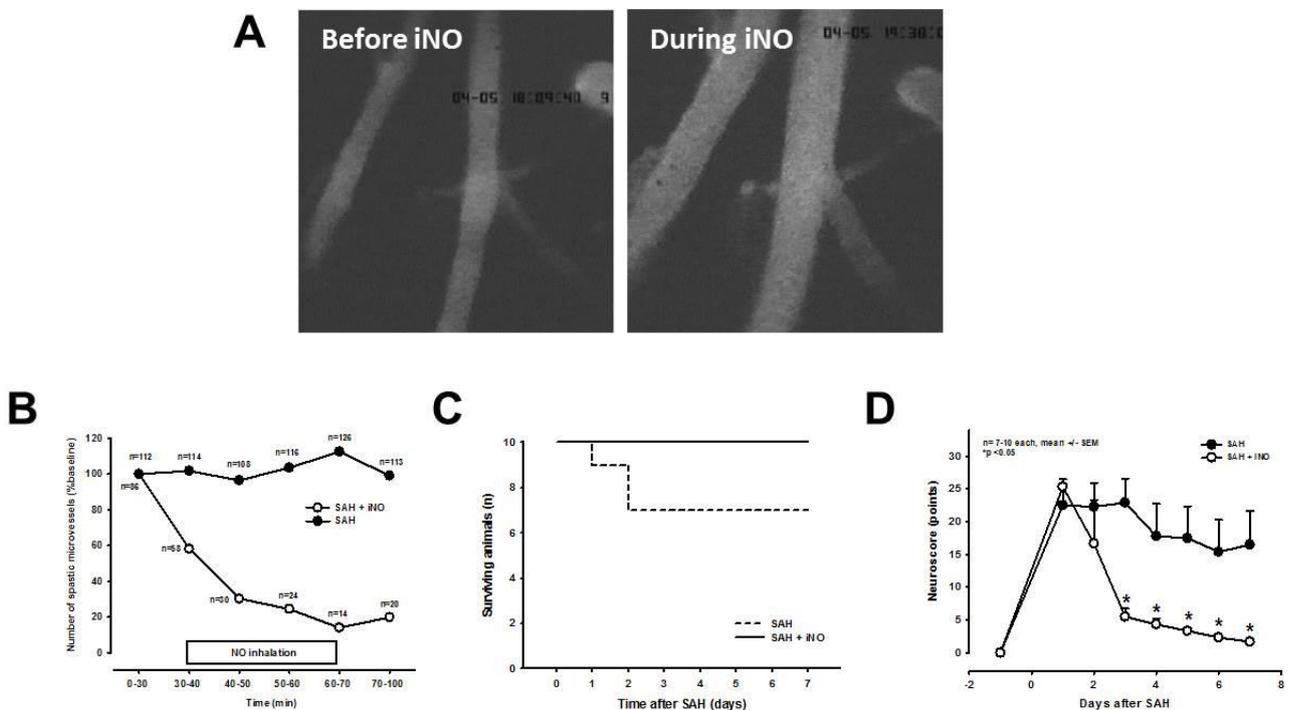
Wasser-Gehalt, der ein Maß vor allem für das zytotoxische Hirnödem ist (**Abbildung 15A**), reduziert, was darauf hindeutet, dass die durch iNO-induzierte Verbesserung der posttraumatischen Durchblutung zu einer Verringerung der sekundären Mechanismen führt, die letztendlich eine Zellschwellung verursachen würden. Zudem war auch die Störung der Blut-Hirn-Schranken-Integrität (gemessen anhand der Evans Blue-Extravasation, **Abbildung 15B**) reduziert; hierbei spielt

wahrscheinlich eine Rolle, dass das durch die Inhalation zugeführte NO die Blut-Hirn-Schranken-Permeabilität verringert (Khan et al., 2009; Mark et al., 2004), iNO also auch zur Reduktion des vasogenen Hirnödems beitragen kann. Zusammenfassend zeigt sich auch beim experimentellen SHT eine positive Wirkung der NO-Inhalation, welche wahrscheinlich hauptsächlich auf eine selektive Durchblutungsverbesserung in der traumatischen Penumbra zurückgeführt werden kann. Zudem zeigt sich eine positive Wirkung auf die Hirnödementstehung. Wie im Falle des ischämischen Infarkts hat eine potentielle iNO-Therapie den Vorteil, dass weder in der vorliegenden Untersuchung noch in den bisherigen experimentellen und klinischen Studien relevante Nebenwirkungen auftraten, die potentiell neurotoxisch sind. Weitere positive iNO-Wirkungen wie z. B. die Verringerung von Mikrothrombosen, die eine Rolle beim sekundären Nekrosewachstum spielen (Maeda et al., 1997; Schwarzmaier et al., 2010) oder die Reduktion inflammatorischer Vorgänge sind denkbar und in anderem Kontext nachgewiesen (Adrie et al., 1996; Fox-Robichaud et al., 1998), müssen jedoch im Zusammenhang mit dem SHT noch abschließend untersucht werden.

#### 4.1.3 Manuskript 4: Stickstoff-Monoxid-Inhalation reduziert die frühe posthämorrhagische Störung der Mikrozirkulation nach experimenteller Subarachnoidalblutung und verbessert das Outcome nach SAB

In den letzten Jahren zeigt sich zunehmend, dass bereits früh nach Subarachnoidalblutung auftretende pathophysiologische Vorgänge zu einer Störung der zerebralen Mikrozirkulation führen, deren Ausmaß wahrscheinlich maßgeblich die neurologische Prognose der SAB-Patienten bestimmt. Zu den Ursachen der mikrozirkulatorischen Dysfunktion zählen unter anderen Verengungen von arteriellen Mikrogefäßen, sogenannte Mikrovasospasmen. Sie lassen sich sowohl bei Patienten (Pennings et al., 2004; Uhl et al., 2003) als auch im Mausmodell (Friedrich et al., 2012; Sun et al., 2009) nachweisen. Die genauen Ursachen des Phänomens und seine Relevanz für das posthämorrhagische Outcome sind jedoch bisher unbekannt; es gibt jedoch deutliche Hinweise, dass auch für diese Pathologie ein NO-Defizit verantwortlich sein könnte. Wird 3 Stunden nach Induktion der Subarachnoidalblutung (d. h. zum Zeitpunkt, an dem die MVS bereits maximal ausgeprägt sind (Friedrich et al., 2012) mit der NO-Inhalation begonnen, kommt es innerhalb weniger Minuten zu einer arteriellen Vasodilatation (**Abbildung 16A**), die Anzahl der Mikrovasospasmen sinkt signifikant (**Abbildung 16B**); nach 20 Minuten iNO ist die Gesamtzahl der MVS um ca. 80% im Vergleich zum Ausgangswert reduziert. Anders als beim ischämischen Infarkt und beim Schädel-Hirn-Trauma, wo der iNO-Effekt auf die zerebralen Gefäße bereits kurz nach Beendigung der Inhalation rückläufig war, ist bei der Subarachnoidalblutung ein bleibender positiver Effekt auf die Mikrovasospasmen nachweisbar (zumindest für bis zu 30 Minuten nach Beendigung der Inhalation). Wird die NO-Inhalation für 24 Stunden durchgeführt, hat

dies einen deutlichen Effekt auf die posthämorrhagische Mortalität: Während in der Kontrollgruppe eine für das MCA-Perforations-Modell typische Mortalität von 30% über 7 Tage auftritt, überlebten alle Tiere der iNO-Gruppe (**Abbildung 16C**); die überlebenden Tiere zeigten zudem deutlich bessere Leistungen in einem SAB-spezifischen Neuroscore (**Abbildung 16D**), iNO führte also auch zu einer signifikanten Verbesserung des neurologischen Outcomes. Hiermit kann erstmalig direkt nachgewiesen werden, dass eine lokale NO-Depletion ein wichtiger kausaler Faktor in der Pathophysiologie des MVS und somit beim early brain injury (Ostrowski et al., 2006; Sabri et al., 2013; Sehba et al., 2012) ist. Mögliche Ursachen für die reduzierte NO-Konzentration sind ein direktes Scavenging von NO durch subarachnoidales Blut, das sich entlang der Mikrogefäße ausbreitet, sowie ein von Sehba indirekt nachgewiesener Abfall der endothelialen NO-Produktion durch eNOS-Dysfunktion (Sehba et al., 2000; Sehba et al., 2004). Zudem betonen die Ergebnisse der Studie die Bedeutung der frühen Mikrozirkulationsstörung und der Mikrovasospasmen für das posthämorrhagische Outcome: durch eine iNO-induzierte Reduktion der mikroarteriellen Konstriktion und der MVS kann eine signifikante Reduktion sowohl der Mortalität als auch des neurologischen Defizits erzielt werden.



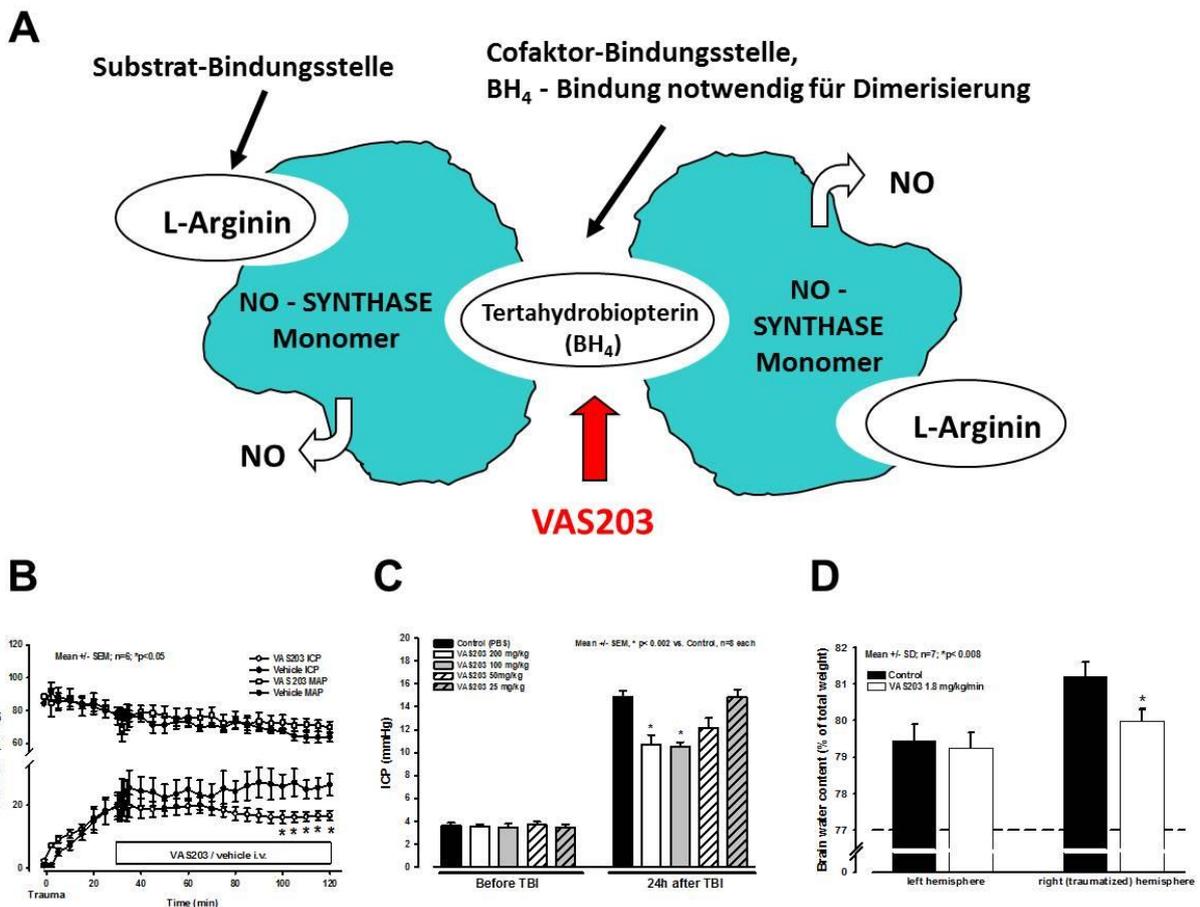
**Abbildung 16.** NO-Inhalation nach experimenteller SAB. A. Unter NO-Inhalation zeigt sich in diesem exemplarischen IVM-Bild eine signifikante arterielle Vasodilatation. B. Die Zahl der Spasmen nimmt unter iNO signifikant ab; der Effekt bleibt auch bis zu 30 Minuten nach Ende der NO-Therapie bestehen. Nach 24-stündiger

iNO-Gabe überlebten alle Tiere der Gruppe; zudem boten sie eine deutlich schnellere neurologische Erholung und eine deutlich bessere Leistung in neurologischen Testverfahren.

#### 4.1.4 Manuskript 5: NO-Synthase-Inhibition reduziert den posttraumatischen Hirnschaden, insbesondere das posttraumatische Hirnödem, nach experimentellem Schädel-Hirn-Trauma

Nach Trauma kommt es nach einem kurzfristigen Aktivitäts-Peak direkt nach dem traumatischen Insult, der wenige Sekunden bis Minuten anhält, bereits nach wenigen Minuten zu einer Aktivitätsminderung der konstitutiven NO-Synthasen, die zu einem lokalen NO-Mangel führt, dessen Abmilderung, z. B. durch die NO-Inhalation, neuroprotektiv ist. In der Folgezeit nach SHT kommt es zu einer deutlichen Induktion der induzierbaren NO-Synthase (iNOS), die zu einem im Verlauf auftretenden zweiten Peak der NO-Konzentration nach Stunden bis Tagen führen kann (siehe **Abbildung 4**, Einleitung); hierzu muss die unter physiologischen Bedingungen im Hirngewebe nicht aktive iNOS zunächst neu synthetisiert werden und dimerisieren. Absolut betrachtet ist die NO-Konzentration nach Trauma jedoch längerfristig reduziert (Cherian et al., 2004). Das von iNOS synthetisierte NO scheint in Bezug auf das sekundäre Nekrosewachstum eine negative Rolle zu spielen: Genetische Elimination (Foley et al., 2008; Gahm et al., 2006) oder pharmakologische Inhibierung (Jafarian-Tehrani et al., 2005; Stoffel et al., 2000) der iNOS sind mit deutlicher Neuroprotektion nach Schädel-Hirn-Trauma vergesellschaftet. 4-amino-tetrahydro-L-biopterin (VAS203) ist ein neuartiger nicht-kompetitiver NO-Synthase-Inhibitor, der das NOS-Molekül nicht an der Substrat (d. h. NO-) - Bindungsstelle, sondern an der Bindungsstelle des essentiellen Kofaktors Tetrahydrobiopterin (BH<sub>4</sub>) bindet und hochspezifisch für NOS ist. In vitro hemmt VAS203 alle NOS-Isoformen gleich potent. Durch seine Wirkungsweise inhibiert VAS203 jedoch in vivo nahezu ausschließlich neu synthetisierte NOS-Moleküle, da sich die NOS-Moleküle über BH<sub>4</sub> zu Dimeren zusammenschließen müssen, um ein funktionelles NO-Molekül zu bilden (**Abbildung 17A**). Da in vivo die konstitutiven Isoformen, d. h. die neuronale und endotheliale NOS, bereits als Dimer bzw. aktiv vorliegen, ist VAS203 also in vivo ein relativ spezifischer iNOS Inhibitor, auf die Situation nach Trauma bezogen ist eine nahezu ausschließliche iNOS-Hemmung zu erwarten, da die konstitutiven Isoformen nNOS und eNOS in Aktivität und Expression gehemmt sind und nur iNOS-Moleküle aktiviert und neu synthetisiert werden. Eine weitere positive Eigenschaft von VAS203 besteht darin, dass auch die Bildung freier Radikale, die durch Entkoppelung der NOS-Moleküle (engl. uncoupling) entstehen, verhindert wird. In der vorliegenden Studie kann gezeigt werden, dass VAS203 nach experimentellem Schädel-Hirn-Trauma dosisabhängig zu einer Reduktion der intrakraniellen Hypertension führt, ohne dass substanzbedingte, potentiell neurotoxische Nebenwirkungen nachgewiesen werden konnten. Der Effekt setzt rasch nach Beginn der Infusion ein

(Abbildung 17B) und führt zu einer deutlichen Reduktion des intrakraniellen Drucks nach 3 und 24 Stunden (Abbildung 17C). Zudem zeigt sich eine signifikante Reduktion der Hirnödementstehung (Abbildung 17D). Immunhistochemisch kann zudem eine Reduktion nitrosylierter Proteine im Gehirnparenchym nachgewiesen werden, was auf eine Reduktion der Bildung reaktiver Sauerstoff- und Nitrosoverbindungen, hindeutet. Diese könnten einerseits durch eine Reduktion des Uncoupling begründet sein, allerdings verringert die iNOS-Hemmung auch den relativen, iNOS-bedingten NO-Anstieg und somit auch die oxidativen Folgeschäden der im Verlauf freigesetzten NO-Moleküle. Dies ist die erste Studie, die in vivo zeigte, dass die neue Klasse der BH<sub>4</sub>-Analoge erfolgreich den sekundären Hirnschaden nach experimentellem SHT reduzieren kann; mechanistisch wird dies wahrscheinlich durch iNOS-Hemmung erzielt. Die Mehrheit der experimentellen und klinischen Studien weist darauf hin, dass iNO den posttraumatischen Hirnschaden negativ beeinflusst; es gibt jedoch auch vereinzelt Hinweise, dass die iNOS in der späteren Phase nach Trauma an Regenerationsvorgängen beteiligt ist, sich eine Hemmung der iNO also potentiell auch negativ auswirken könnte (Levy et al., 2001; Sinz et al., 1999); diese Vorgänge spielen sich jedoch in der chronischen Phase nach SHT ab und sind nicht relevant für den akuten Hirnschaden bzw. Phänomene wie die intrakranielle Hypertension und die Hirnödementstehung in der Akutphase (erste 24 Stunden nach Trauma), in der das Medikament in der vorliegenden Studie zum Einsatz kommt.



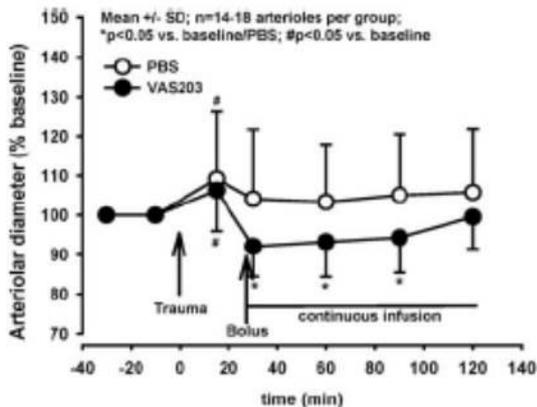
**Abbildung 17.** 4-amino-tetrahydro-L-biopterine (VAS203) nach experimentellem SHT. A. Schematische Darstellung der Wirkungsweise der BH<sub>4</sub>-Analoga zur nicht-kompetitiven NOS-Hemmung. Nach CCI senkt VAS203 den ICP (B), der bis zu 24 h nach Trauma in der VAS203-Gruppe signifikant niedriger ist (C). D. Der Hirn-Wassergehalt ist 24h nach SHT ebenfalls signifikant erniedrigt.

Die Ergebnisse der Studie spiegeln auch die komplexe Rolle und die differentielle Regulierung des NO-Stoffwechsels nach SHT wieder. Wie in Manuskript 3 beschrieben ist die Gabe von NO zur Deckung der lokalen Depletion neuroprotektiv; hierbei scheint vor allem das Defizit, das durch die eNOS-Dysfunktion entsteht, ausgeglichen zu werden; dies deckt sich auch mit anderen Untersuchungen (Cherian et al., 2003; Hlatky et al., 2003). iNOS-produziertes NO, das mit Verzögerung nach Trauma synthetisiert wird (da iNOS erst exprimiert und aktiviert werden muss) und zu einem verzögerten NO-Anstieg (**Abbildung 4**) führt, wiederum scheint – zumindest in der Akutphase nach Trauma – neurotoxisch zu sein (Foley et al., 2008; Jafarian-Tehrani et al., 2005; Louin et al., 2006).

#### 4.1.5 Manuskript 6: Die initiale Vasodilatation nach Schädel-Hirn-Trauma wird durch die endotheliale NO-Synthese vermittelt

Nach Trauma kommt es zu einer kurz andauernden vorübergehenden Dilatation von arteriellen Gefäßen in der zerebralen Mikrozirkulation (DeWitt et al., 1986; Schwarzmaier et al., 2010; Thomale et al., 2002; Wei et al., 1980). Das Phänomen wird mit dem sich schnell entwickelnden Anstieg des intrakraniellen Drucks nach Trauma in Zusammenhang gebracht und als „vascular engorgement“ bezeichnet. Die Ursache dieser Dilatation ist bisher unklar, es wird jedoch vermutet, dass sie in Zusammenhang mit dem kurz andauernden Anstieg der NO-Konzentration, der sich direkt nach Trauma nachweisen lässt (Cherian et al., 2000; Cherian et al., 2004), stehen könnte. In der vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, dass die frühe Vasodilatation, die sich in den ersten 30-60 Minuten in unserem Mausmodell nachweisen lässt, in eNOS-knock out Mäusen komplett ausbleibt. In nicht-transgenen Tieren kann sie durch NOS-Hemmung mit VAS203 verhindert werden (**Abbildung 18**). Diese Studie liefert einen erstmaligen Hinweis darauf, dass die frühe Vasodilatation NO-bedingt ist und mit hoher Wahrscheinlichkeit durch eNOS vermittelt wird; zudem kann so die nahezu sofort nach Trauma einsetzende ICP-senkende Wirkung von VAS203, die in der vorherigen Studie nachgewiesen wurde, besser erklärt werden: eine rasch einsetzende Vasokonstriktion führt zu einer schnellen Senkung des intrakraniellen Blutvolumens und somit zu einer Reduktion des intrakraniellen Drucks. Im weiteren Verlauf normalisiert sich in der vorliegenden Studie die Gefäßweite unabhängig von der Weiterführung der VAS203-Therapie, passend zur Tatsache, dass es durch das Trauma zu einer zunehmenden eNOS-Dysfunktion/ -Inaktivierung kommt. Im weiteren Verlauf dominiert dann am ehesten die iNOS-

inhibierende Wirkung von VAS203, die wahrscheinlich hauptsächlich für die Verringerung des posttraumatischen Hirnschadens (siehe Manuskript 5) verantwortlich ist.



**Abbildung 18.** eNOS vermittelt die direkt nach CCI nachweisbare Vasodilatation. Nach CCI zeigt sich eine geringe, jedoch signifikante Erweiterung zerebraler Arteriolen (t=10 min); diese lässt sich durch NOS-Inhibition mit VAS203 komplett aufheben. Im Verlauf normalisieren sich die Gefäßdurchmesser spontan, eine Weiterführung der NOS-Inhibition mit VAS203 hat keinen Einfluss auf diese Normalisierung.

#### 4.1.6 Zusammenfassung und Beurteilung der Manuskripte 1 bis 6

In den vorliegenden 6 Manuskripten wird die komplexe Rolle von Stickstoff-Monoxid in der Pathophysiologie zerebraler Insulten genauer untersucht. Nach Insult ist ein kurzer NO-Peak nachweisbar (Cherian et al., 2004; Dalkara et al., 1994; Hanggi et al., 2006; Kader et al., 1993); dieser kurze Anstieg ist möglicherweise der akuten mechanischen Gewebeverletzung geschuldet (Aufprall beim SHT, Gefäßruptur im Rahmen der SAB). Beim SHT wird er in Zusammenhang mit einer kurz andauernden Vasodilatation direkt nach Trauma gebracht, die in experimentellen (Schwarzmaier et al., 2010; Wei et al., 1980) und klinischen (Kelly et al., 1996) Studien nachgewiesen werden konnte und die direkt nach Trauma zur Hyperämie und somit zum schnellen Anstieg des intrakraniellen Drucks führen kann. In Manuskript 6 konnte erstmalig gezeigt werden, dass diese Vasodilatation eNOS-bedingt ist. Die Phase der erhöhten NO-Konzentration und der Vasodilatation dauert jedoch nur kurz an (Schwarzmaier et al., 2010; Schwarzmaier et al., 2015b). Bereits wenige Minuten nach Insult kommt es – unabhängig von der Art des Insults - zu einem lokalen Mangel von Stickstoff-Monoxid, der mit hoher Wahrscheinlichkeit durch die Aktivitätsminderung bzw. Inaktivierung der Hauptproduktionsquelle endogenen NOs, der endothelialen NO-Synthase – begründet ist; auch die neuronale NOS ist in Aktivität und Expression vermindert und trägt zur NO-Depletion bei (Dalkara et al., 1994; Faraci et al., 1994; Iadecola et al., 1994; Jiang et al., 2002; Kader et al., 1993; Santizo et al., 2000; Wada et al., 1998), die Bedeutung der nNOS scheint jedoch für den akuten Sekundärschaden eher untergeordnet zu sein. Der NO-Mangel ist in den Hirnregionen, die nach Insult kritisch durchblutet sind, am relevantesten. Beim ischämischen Schlaganfall und bei (kontusionellen) Schädel-Hirn-Trauma lässt er sich insbesondere in der Penumbra um den Primär-Insult herum nachweisen; NO-Depletion ist dort ein wichtiger Faktor, der den sekundären Hirnschaden vorantreibt. Bei der Subarachnoidalblutung ist die Zone der Mangeldurchblutung räumlich-anatomisch nicht so klar definiert, da sich das Blut entlang der Gefäße im Subarachnoidalraum weiter ausdehnen kann, aber auch hier liegt mit hoher

Wahrscheinlichkeit ein eNOS-bedingter NO-Mangel vor (Park et al., 2001; Sehba et al., 2000), der durch die Durchblutungsminderung verursacht werden kann. Allerdings kann bei der SAB der NO-Mangel durch Inaktivierung von NO durch Blutbestandteile noch verschärft werden. In den vorliegenden Manuskripten kann nun für alle drei untersuchten Pathologien gezeigt werden, dass ein Anheben der NO-Konzentration zu einer signifikanten Verbesserung der eingeschränkten Mikrozirkulation führt und dass dies den sekundären (strukturellen) Hirnschaden verringert und das neurologische Outcome verbessert. Der Nachweis erfolgt direkt, d. h. durch Visualisierung der Mikrozirkulation und durch direkte in vivo NO-Fluoreszenz (erstmalige Beschreibung der dynamischen NO-Fluoreszenz-Messung), was im Gegensatz zu vorangegangenen Untersuchungen eine eindeutige räumlich-anatomische Zuordnung erlaubt: Bei der Ischämie und beim SHT ist die periläsionelle Zone, die Penumbra, am stärksten vom NO-Mangel betroffen, bei der SAB die kleinsten (bis 25 µm Durchmesser) Gefäße der Mikrozirkulation im MCA-Territorium. Neuartig ist auch die in Manuskript 1 beschriebene Methode der NO-Inhalation zur Therapie eines zerebralen NO-Mangels. Seit ihrer Einführung vor ca. 20 Jahren hat sich die NO-Inhalation als effektive und sichere Therapie zur Behandlung pulmonaler Erkrankungen etabliert; als großer Vorteil wurde postuliert, dass die arterielle Vasodilatation aufgrund der Applikationsart rein auf Lungengefäße beschränkt bleibt. Tatsächlich fanden sich in Studien während der Anwendung von iNO zur Lungentherapie keine Hinweise auf eine Beeinflussung der zerebralen Zirkulation. In den Publikationen der Antragstellerin (v. a. Manuskript 1) konnte nicht nur direkt nachgewiesen werden, dass inhaliertes Stickstoff-Monoxid im Gehirn transportiert und dort freigesetzt wird, es konnte zudem gezeigt werden, dass die Freisetzung auf minderperfundierte/ hypoxische Areale beschränkt ist. Hierdurch erklären sich einerseits die negativen Befunde in vorangegangenen Untersuchungen (da nie Patienten mit zerebraler Ischämie untersucht wurden), zudem hat die selektive iNO-Wirkung entscheidende Vorteile gegenüber anderen NO-basierten Therapieansätzen: NO-Donoren/ NO-Analoga hatten sich zwar in vielen experimentellen Untersuchungen als neuroprotektiv nach zerebralen Insulten erwiesen, die systemische Gabe ist jedoch wegen der ubiquitären Freisetzung mit einer systemischen Vasodilatation vergesellschaftet, führt also zu systemischer Blutdruck-Senkung und somit zu einer Senkung der globalen Hirnperfusion, was die Durchblutung in kritisch hypoxischen Arealen wie der Penumbra oder der posthämorrhagischen Mikrozirkulation eher verschlechtert und so wahrscheinlich die in experimentellen Studien dokumentierten positiven lokalen Effekte zunichtemacht. Zudem fördern diese Therapeutika den sogenannten „Steal-Effekt“: Hirngefäße in normoperfundierten Arealen reagieren auf vasodilatierende Stimuli häufig normal, während Gefäße in ischämischen Parenchymbereichen die Fähigkeit hierzu oft verlieren. Dadurch kommt es bei globaler zerebraler Vasodilatation zu einer Umverteilung des Blutvolumens zugunsten gesunder Hirnareale, eine lokale Ischämie kann so verstärkt werden (Hudetz et al., 1993; Symon, 1969). Durch selektive Vasodilatation in ischämischen Arealen,

wie sie durch iNO erreicht werden kann, kann der Steal-Effekt nicht nur vermieden, sondern sogar in einen sog. „Robin-Hood-Effekt“ umgewandelt werden, d. h. das Blut wird umverteilt von normoperfundierten Arealen (in denen es zu keiner Gefäßreaktion kommt) zum *Tissue at risk* (wo Vasodilatation erfolgt).

Die Manuskripte 1,3 und 4 zeigen also neben einem besseren Einblick in die pathophysiologische Rolle der frühen NO-Depletion nach zerebralem Insult die NO-Inhalation als therapeutische Strategie auf, die sich in unterschiedlichen Modellen und auch im Großtier-Versuch als protektiv gezeigt hat und somit ein hohes translationales Potential hat. Aufbauend auf den Ergebnissen der drei iNO-Studien wurde eine erste klinische Studie bei Patienten mit therapierefraktärer neurologischer Verschlechterung nach Subarachnoidalblutung initiiert (Universität Bern, Schweiz); erste Ergebnisse werden Mitte 2018 erwartet.

Die Ergebnisse der vorliegenden Manuskripte zeigen jedoch auch, dass die die Bedeutung von NO sich im Verlauf der Entwicklung des sekundären Hirnschadens wandelt. Die NO-Supplementierung führt nur dann zu einer signifikanten Verbesserung des Outcome, wenn sie früh nach Insult (d. h. im Tiermodell innerhalb 2 Stunden) begonnen wird. Dies deckt sich mit den Ergebnissen anderer Untersucher und bestätigt das aus der Lyse bzw. Rekanalisationstherapie des Schlaganfalls bekannte knappe Zeitfenster, in dem sekundäre Schädigungskaskaden in der Penumbra durch Verbesserung der Durchblutung erfolgreich aufgehalten werden können (beim Menschen 4,5 bis 6 Stunden). Wird iNO später begonnen, zeigt sich keine Reduktion des strukturellen Hirnschadens, da die sekundären Kaskaden bereits irreversibel angestoßen wurden. In hoher Dosierung (>100 ppm iNO) kann sich der Sekundärschaden sogar vergrößern, d. h. eine NO-Supplementierung in zu hoher Dosierung wirkt eher neurotoxisch.

Endogen kommt es Minuten bis Stunden nach zerebralem Insult zu einer Aktivierung der unter Normalbedingungen nicht vorhandenen induzierbaren NO-Synthase (Berra et al., 2007;Foley et al., 2008;Iadecola et al., 1995a;Iadecola et al., 1996;Petrov et al., 2000;Sayama et al., 1998;Sehara et al., 2006), was im Verlauf von Stunden zu einem relativen Anstieg der NO-Konzentration führt. iNOS-produziertes NO ist mit einer Reihe von neurotoxischen Prozessen (Bildung freier Sauerstoff-Radikale, Nitrosylierung von Proteinen, Induktion inflammatorischer Vorgänge, Bildung von neurotoxischen Nitroso-Verbindungen, induktion von Zelltod-Vorgängen) assoziiert und verstärkt den sekundären Hirnschaden (Garry et al., 2015). Eine genetische oder pharmakologische Hemmung der iNOS zeigte bereits in vielen klinischen Untersuchungen einen neuroprotektiven Effekt nach zerebralen Insulten (Berra et al., 2007;Foley et al., 2008;Iadecola et al., 1995b;Jafarian-Tehrani et al., 2005;Louin et al., 2006;Parmentier et al., 1999;Sayama et al., 1999), viele der verwendeten Inhibitoren sind jedoch nicht isoform-spezifisch, mit Nebenwirkungen behaftet und/ oder aufgrund ihrer Anwendungsweise (topisch, intrazerebroventrikulär) nicht für den klinischen Einsatz geeignet, weswegen es bisher keinen

zur klinischen Therapie zugelassenen iNOS-Inhibitor gibt. 4-amino-tetrahydro-L-biopterin (VAS203), ein in Manuskript 5 und 6 untersuchter, nicht-kompetitiver NOS-Inhibitor ist in vivo aufgrund seiner Wirkungsweise ein relativ spezifischer iNOS-Inhibitor, der experimentell eine rasche und anhaltende ICP-senkende Wirkung zeigte und nach 24-stündiger Therapie eine langanhaltende Neuroprotektion verursachte. Es zeigte sich eine Reduktion der oxidativen Veränderungen, was einerseits auf eine Reduktion iNOS-produzierten NOs zurückgeführt werden kann, andererseits stabilisiert VAS203 die inaktiven konstitutiven NOS-Dimere, deren Entkopplung auch freie Sauerstoff-Radikale produzieren kann (Beveris et al., 2006; Cholet et al., 1997; Landmesser et al., 2003; Pall, 2007). Unklar blieb nach der ersten Studie mit VAS203, wieso die ICP-senkende Therapie des Medikaments nahezu sofort nach Beginn der Behandlung (zum Zeitpunkt 30 Minuten nach Trauma) einsetzte, da zu diesem Zeitpunkt die iNOS-Aktivierung noch nicht ihr Maximum erreicht haben dürfte (Gahm et al., 2000); die direkte Visualisierung der zerebralen Gefäße zeigt, dass die nach CCI auftretende transiente Vasodilatation durch VAS203 verhindert wird, was eine kurzfristige Reduktion des intrazerebralen Blutvolumens und – konsekutiv – des intrakraniellen Drucks zur Folge hat. Nachdem das Phänomen der Vasodilatation jedoch nur kurze Zeit (unter 60 Minuten nach SHT) anhält und der VAS203-Effekt auf die Gefäßweite sich innerhalb von 20 Minuten verliert, bestätigt sich die iNOS-Inhibition als der vorherrschende neuroprotektive Wirkmechanismus des Medikaments.

Aufbauend auf den Ergebnissen der Manuskripte 5 und 6, die von der Antragstellerin als Erst- bzw. als Koautorin publiziert wurden, wurde eine Phase 1 klinische Studie initiiert, die den positiven, ICP-senkenden Effekt des Compounds VAS203 nach schwerem Schädel-Hirn-Trauma bestätigen konnte, zudem war bei Patienten nach VAS203-Therapie ein verbessertes neurologisches Outcome nachweisbar (Stover et al., 2014). Seit Mitte 2016 wird eine klinisch kontrollierte, multizentrische Phase-III-Studie in Patienten mit schwerem Schädel-Hirn-Trauma durchgeführt (NOSTRA-III), erste Ergebnisse werden Ende 2018 erwartet. Bei dieser Studie handelt es sich um die einzige derzeit durchgeführte pharmakologische Studie zum SHT.

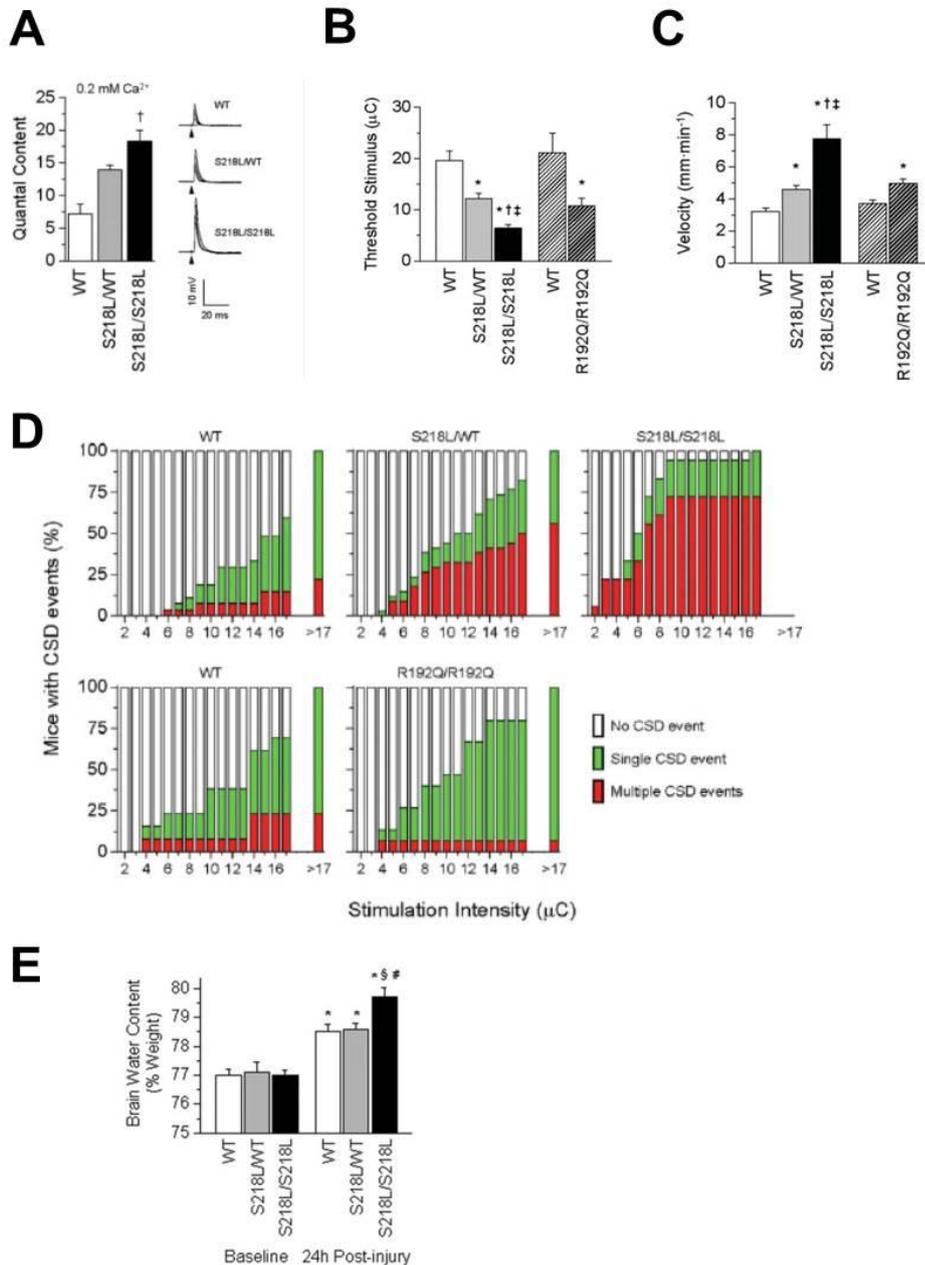
## 4.2 Molekulare Mechanismen der Hirnödementstehung nach experimentellem Schädel-Hirn-Trauma als mögliches therapeutisches Target

### 4.2.1 Manuskript 7: Gain-of-function Mutationen im spannungsabhängigen Cav2.1. Calcium-Kanal führen zu einer massiven Steigerung des posttraumatischen Hirnödems und sind mit einem schlechten neurologischen Outcome assoziiert

Familiäre hemiplegische Migraine Typ I (FHM 1), eine seltene, autosomal dominant vererbte Form der Migraine, wird durch Punktmutationen im CACNA1a Gen (Chromosom 19) verursacht, das den neuronalen, spannungsabhängigen Ca<sub>v</sub>2.1-Kalzium-Kanal kodiert (Barrett et al., 2008; Ferrari,

1998;Stam et al., 2008). Neben den typischen halbseitigen pulsierenden Kopfschmerz-Attacken, die von transienten neurologischen Symptomen wie der namensgebenden Hemiplegie begleitet werden, können Patienten besonders schwerwiegende Verläufe nach leichtem Schädel-Hirn-Trauma aufweisen: Einzelfallberichte schildern Fälle von FHM1-Patienten, die nach milden Kopf-Verletzungen ein massives, therapierefraktäres Hirnödem mit schwerem klinischen Verlauf entwickeln (Debiais et al., 2009;Stam et al., 2009), in einem der Fallberichte sogar mit tödlichem Ausgang (Kors et al., 2001). Insbesondere scheint dieser schwere Phänotyp mit der S218L Mutation vergesellschaftet zu sein (Austausch Serin mit Leucin an Position 218), andere Mutationen wie die R192Q-Mutation sind mit einem klinisch etwas weniger schwer ausgeprägtem Krankheitsverlauf vergesellschaftet. Die Ursachen des FHM1-assoziierten gesteigerten posttraumatischen Hirnschadens sind unklar. An speziell für dieses Projekt generierten Knock-in Tieren, welche die menschliche S218L-Mutation tragen, wird in der von der Antragstellerin als Erstautorin veröffentlichten Arbeit gezeigt, dass die Punktmutationen zu einer gesteigerten Empfindlichkeit gegenüber kortikalen Streudepolarisationen führen, die wiederum die gesteigerte Ödembildung bedingen. Die S218L-Mutation führt gen-dosis-abhängig zu einem sogenannten „gain of function“ des  $Ca_v2.1$  Kanals, d. h. er öffnet sich bereits bei niedrigeren Auslöseschwellen, zudem wird pro Kanal-Öffnung mehr Neurotransmitter (Glutamat) freigesetzt (quantal content, **Abbildung 19A**). Kortikale Streudepolarisationen können deswegen ebenfalls gen-dosis-abhängig mit geringeren Stromstärken (niedrigere Auslöseschwelle, engl. threshold) ausgelöst werden (**Abbildung 19B**) und breiten sich schneller aus (**Abbildung 19C**); zudem können mit einem elektrischen Stimulus in höheren Reizstärken multiple CSDs ausgelöst werden, was bei Wildtyp-Tieren (WT) oder bei der zu einer mildereren Dysfunktion führenden R192Q Mutation nur sehr selten auftritt (**Abbildung 19D**). Nach sehr mildem SHT kommt es zu einem signifikant höheren Anstieg des Hirnwassergehalts in S218L-mutanten Tieren, vereinbar mit deutlich höherer Hirnödementwicklung (**Abbildung 19E**). In dieser Studie werden die Folgen der S281L Mutation erstmalig in vivo untersucht. CSDs sind ein anerkanntes pathophysiologisches Korrelat für Migraine-Auren- und -Attacken (Bowyer et al., 2001), ihre Rolle bei der Entstehung des posttraumatischen Hirnödems ist noch nicht abschließend geklärt. Es ist bekannt, dass eine (mechanisch/ elektrisch induzierte) CSD zu einem transienten (lokalen) Anstieg des Hirn-Wassergehalts führen kann (Gursoy-Ozdemir et al., 2004), der unter physiologischen Bedingungen jedoch nur kurzfristig andauert. Anhaltende CSDs können jedoch zu einer Ischämie führen (Takano et al., 2007), da nicht die Rekompensation nach CSD ein energieaufwändiger Prozess ist, der in vorgeschädigten/ minderperfundierte Gewebe wie der traumatischen Penumbra nicht zur Gänze erfolgen kann; in diesem Fall kann sich eine Gewebeischämie sogar verstärken und somit den sekundären Hirnschaden verstärken (Chase, 2014). Der bei der FHM1 betroffene  $Ca_v2.1$ -Kanal wurde bisher noch nicht in Zusammenhang mit dem posttraumatischen Hirnödem und dem sekundären Hirnschaden gebracht; die Erforschung der genauen Mechanismen

und die Auslotung eines möglichen therapeutischen Potentials durch medikamentöse Beeinflussung des Kanals sind Gegenstand einer aktuellen experimentellen Untersuchung der Antragstellerin.

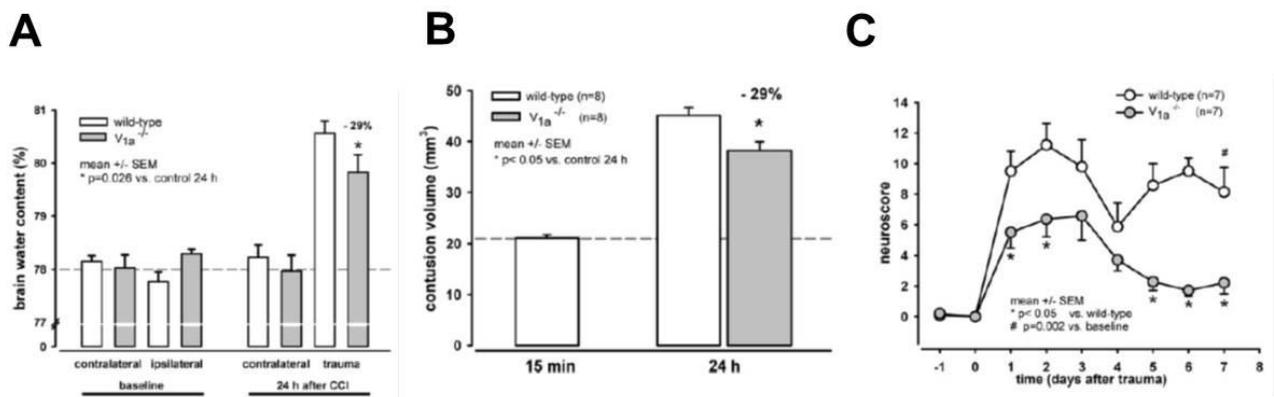


**Abbildung 19.** Pathophysiologie der S218L-Mutation im Gehirn. Die S18L-Mutation führt zu A. einer höheren Neurotransmitter-Freisetzung; wie alle folgenden Ergebnisse zeigt sich hier ein Gen-Dosis-Effekt: Die Veränderungen sind in heterozygot transgenen Tieren weniger stark ausgeprägt als in homozygoten. B. Die Auslöseschwelle für elektrisch induzierte CSDs ist in transgenen Tieren signifikant erniedrigt, in der schwerwiegenden S218L Mutation wie in der R192Q Mutation, die mit einem milderen Phänotyp vergesellschaftet ist. Auch die Propagationsgeschwindigkeit der CSDs (C) ist in mutanten Tieren signifikant erhöht. D. IN diesem Experiment wird repetitiv elektrisch stimuliert; dies führt ab einer bestimmten Frequenz und Stromstärke bei Wildtyp-Tieren (linke Panels) zu einem CSD-Ereignis (grün), selten und nur bei sehr hohen

Stärken zu multiplen Depolarisationswellen (rot). Bei transgenen Tieren ist es sowohl in der S218L- als auch in der R192Q-Mutation signifikant häufiger. E. Nach mildem SHT zeigt sich – erneut gen-dosis-abhängig – eine signifikant gesteigerte Hirnödementstehung.

#### 4.2.2 Manuskript 8: Vasopressin 1a-Rezeptoren spielen eine wichtige Rolle bei der Entstehung des posttraumatischen Hirnödems

Vasopressin, auch antidiuretisches Hormon oder Arginin-Vasopressin (AVP) genannt, ist ein zyklisches Nonapeptid, das im Hypothalamus gebildet und in der Neurohypophyse gespeichert wird. Es ist hauptverantwortlich für die Aufrechterhaltung der Blutdruck-(vaskuläre V1a-Rezeptoren), Wasser- und Elektrolythomöostase (renale V2 Rezeptoren). Im zentralen Nervensystem wirkt Vasopressin als Neurotransmitter und Neuromodulator (Buijs, 1978; Raggenbass, 2008; Sofroniew, 1983), beeinflusst die Permeabilität zerebraler Kapillaren (Doczi, 1993), die Ionenhomöostase (Cserr et al., 1992; DePasquale et al., 1989), das Astrozytenvolumen (Latzkovits et al., 1993), die Durchblutung des Plexus choroideus und die Liquorproduktion (Faraci et al., 1988). Im Gehirn sind unter physiologischen Bedingungen hauptsächlich V1a-Rezeptoren exprimiert (u. a. auf Neuronen, Astrozyten und zerebralen Gefäßen) (Brinton et al., 1984; Pearlmutter et al., 1988; Szmydynger-Chodobska et al., 2004). AVP-Rezeptor-Antagonisten konnten in vorangegangenen experimentellen Studien den Hirnschaden nach zerebraler Ischämie (Kleindienst et al., 2006; Vakili et al., 2005) oder SHT (Trabold et al., 2010) reduzieren; die verwendeten, meist peptidischen Inhibitoren sind jedoch nicht komplett receptorspezifisch und müssen intrazerebroventrikulär verabreicht werden, weswegen eine genaue Differenzierung der Rolle der einzelnen Rezeptor-Subtypen V1a und V2 für die Hirnödementstehung nicht mit letzter Sicherheit möglich ist. In der vorliegenden Studie wurden deswegen V1a-Rezeptor transgene Tiere ( $V1a^{-/-}$ ) verwendet.  $V1a^{-/-}$  Mäuse zeigten eine signifikant geringere Hirnödementwicklung (**Abbildung 20A**); konsekutiv war ein deutlich verringerter posttraumatischer Hirnschaden nachweisbar (**Abbildung 20B**); zudem war die neurologische



**Abbildung 20.** Vasopressin 1a-Rezeptor-Defizienz nach experimentellem SHT. A.  $V1a^{-/-}$  Tiere bieten nach Trauma einen signifikant geringeren Hirn-Wasser-Gehalt, vereinbar mit geringerem posttraumatischem Hirnödem. B. Dies

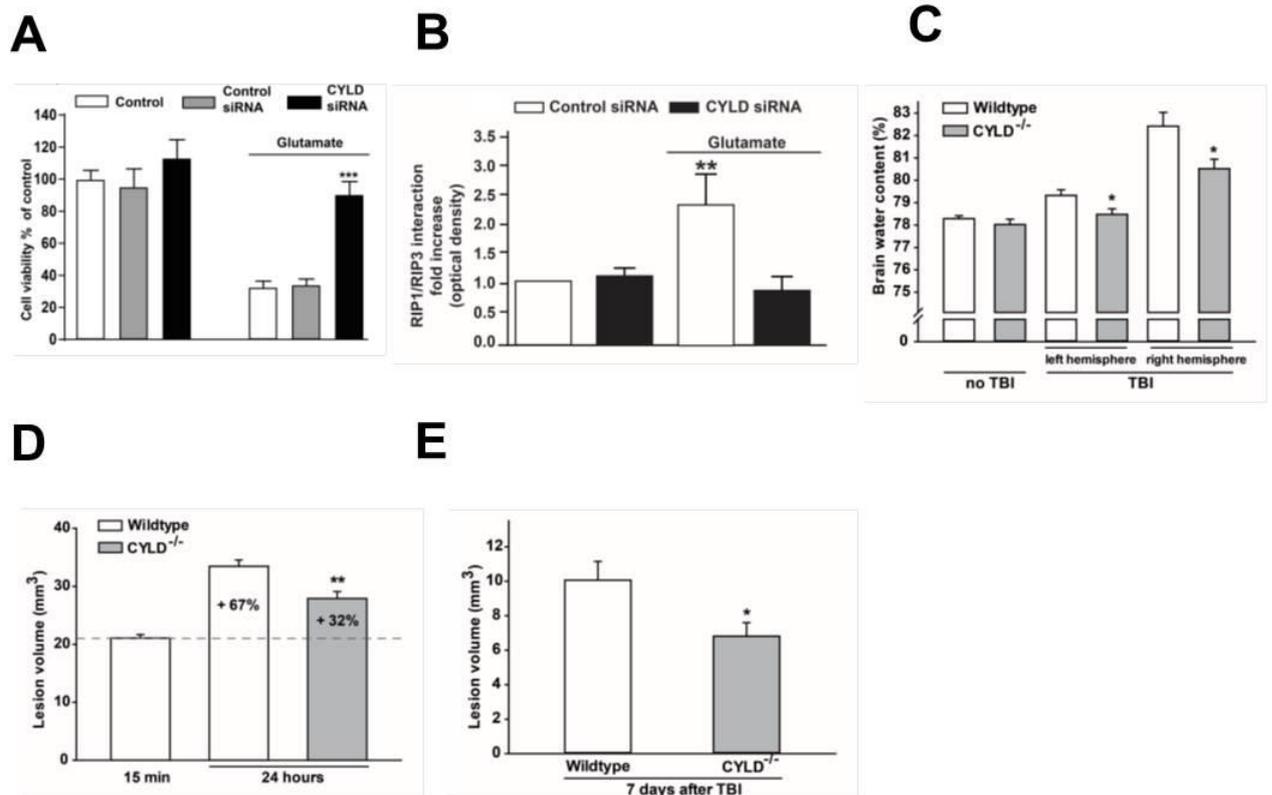
führt zu einem signifikant geringerem posttraumatischen Hirnschaden, die neurologische Erholung (C) ist signifikant schneller und vollständiger als in nicht-transgenen Geschwistertieren.

Erholung der Tiere nach experimentellem SHT im Vergleich zu nicht-transgenen Geschwistertieren deutlich rascher und besser (**Abbildung 20C**). Hiermit kann die wichtige Rolle der V1a-Rezeptoren für die Hirnödementstehung bestätigt werden.

#### 4.2.3 Manuskript 9: CYLD-Defizienz schützt vor oxidativer Schädigung und reduziert signifikant die posttraumatische Hirnödementstehung

Das Tumor-Suppressor-Gen Cyldromatosis (CYLD) ist eine Deubiquitinase (Bignell et al., 2000), die überall im Körper vorkommt und eine wichtige Regulator-Funktion bei der Zellproliferation und inflammatorischen Vorgängen spielt. Zudem wurde CYLD als ein Mediator der Nekroptose identifiziert, einer Form des programmierten Zelltodes, die von Todes-Rezeptoren (engl. death receptors, z. B. Tumor-Nekrose-Faktor  $\alpha$ , TNF $\alpha$ ) induziert wird und die eine wichtige Rolle bei inflammatorischen Vorgängen spielt (Newton et al., 2016; Pasparakis et al., 2015). Die Nekroptose, auch als „kontrollierte Nekrose“ bezeichnet, wird hauptsächlich über die Bildung des sogenannten Nekroptosom, eine Komplexbildung aus den Receptor-Interacting-Protein-Kinasen (RIP) 3 und RIP-1 sowie deren nachgeschalteter Substrat Mixed Lineage Kinase like Protein (MLKL) vermittelt wird. CYLD führt zu Zelltod, indem es RIP1 deubiquitiniert; eine Hemmung dieses Vorgangs verbessert das Zellüberleben (Bertrand et al., 2008; Vanlangenakker et al., 2011), zudem scheint CYLD ein negativer Regulator des Transkriptionsfaktors Kappa-B (engl. nuclear factor  $\kappa$  B, NF $\kappa$ B) zu sein (Kovalenko et al., 2003). Die Rolle von Nekroptose beim posttraumatischen Hirnschaden ist bisher kaum bekannt, zudem sind die Mechanismen unklar. Nach experimentellem Trauma steigt die Expression von Nekroptose-Mediatoren wie RIP1, MLKL und nachgeschalteter pro-inflammatorischer Zytokine an (Liu et al., 2016); der RIP1-Inhibitor Necrostatin-1 reduziert den posttraumatischen Hirnschaden (Wang et al., 2012; You et al., 2008). Dieser Inhibitor ist jedoch wenig spezifisch, zudem sind die Ergebnisse inkonsistent. Die vorliegenden experimentellen Studien liefern zudem keine mechanistische Erklärung für die beobachtete Protektion. In Manuskript 9, das von der Antragstellerin als gleichberechtigte Erstautorin veröffentlicht wurde, wurde erstmalig die Rolle des nekroptotischen Zelltods bei der neuronalen Schädigung in vitro und in vivo untersucht. Die Herunterregulation von CYLD (engl. knock down) mittels inhibitorischer RNA-Fragmente (engl. small inhibitory RNA, siRNA) schützt neuronale Zellen vor Glutamat-Toxizität (**Abbildung 21A**) und hypoxischer Zellschädigung bzw. oxidativem Schaden. Dieser Effekt wird nicht durch eine CYLD-bedingte Alteration der NF $\kappa$ B-Aktivität bedingt, CYLD knock down erhöht vielmehr die RIP1-Ubiquitinierung und führt zu einer Reduktion der RIP1/RIP3-Komplexbildung (**Abbildung 21B**), was vermuten lässt, dass dies der Hauptmechanismus der CYLD-vermittelten

Neuroprotektion ist. In vivo führt CYLD-Defizienz zu einer signifikanten Reduktion des Hirn-Wasser-Gehalts nach experimentellem Schädel-Hirn-Trauma (**Abbildung 21C**). Diese verringerte Hirnödementstehung führt zu einer Reduktion des posttraumatischen Hirnschadens (**Abbildung 21D**), die sich bis sieben Tage nach experimentellem SHT nachweisen lässt (**Abbildung 21E**). Somit kann erstmalig die Schlüsselrolle von CYLD beim neuronalen Zellschaden nachgewiesen werden, zudem wird gezeigt, dass die neuroprotektive Wirkung von CYLD über RIP1/ RIP3 vermittelt wird. CYLD könnte ein Target für eine neuroprotektive Therapie sein, pharmakologische Substanzen zur therapeutischen CYLD-Inhibition sind bei den Kollaborationspartnern der vorliegenden Studie in Entwicklung.



**Abbildung 21.** Effekt von CYLD auf den neuronalen Schaden in vitro und nach in vivo. A. CYLD siRNA schützt HT-22 vor Glutamat-induzierter Neurotoxizität, wahrscheinlich durch Reduktion der RIP1/RIP3-Komplex-Bildung (B). C. In vivo führt dies zu einer signifikanten Reduktion des Hirn-Wasser-Gehalts 24h nach CCI, was sich in einer signifikanten Reduktion des sekundären posttraumatischen Hirnschadens (D) bemerkbar macht. Die Protektion lässt sich bis 7 Tage nach CCI nachweisen (E).

#### 4.2.4 Zusammenfassung und Beurteilung der Manuskripte 7 bis 9

In den vorliegenden Manuskripten werden unterschiedliche pathophysiologische Kaskaden untersucht, die zur Entstehung des posttraumatischen Hirnödems beitragen. Der spannungsabhängige neuronale Ca<sub>v</sub>2.1-Kalzium-Kanal und die Ubiquitinase CYLD werden erstmalig in Zusammenhang mit

der posttraumatischen Hirnödementstehung gebracht. Die relevante Rolle von Vasopressin-1a-Rezeptoren beim posttraumatischen Hirnödem wurde zwar bisher schon beschrieben, aufgrund bisher verwendeter nicht komplett spezifischer Inhibitoren ermöglicht Manuskript 8 jedoch erstmalig durch Verwendung von Rezeptor-Subtyp-spezifischen transgenen Mäusen die genaue Charakterisierung der Vasopressin – Wirkung am V1<sub>a</sub>-Rezeptor.

Das posttraumatische Ödem ist ein zentraler Faktor in der Pathogenese des SHT und bestimmt die neurologische Prognose maßgeblich mit. Bisher beschränken sich die Therapieoptionen sich auf symptomatische Maßnahmen (Carney et al., 2017): die Aufrechterhaltung eines ausreichenden Perfusionsdrucks sowie die Senkung des zerebralen Energiebedarfs (durch Sedativa bis hin zum Barbiturat-Koma) zur Vermeidung von Ischämien, osmotische Diurese (mit hyperosmotischen Reagentien wie Mannitol oder hypertoner Kochsalzlösung); als sehr effektive chirurgische Methode zur raschen ICP-Senkung steht zudem die Entlastungstrepanation zur Verfügung, auf die jedoch aufgrund der Komplexität des Themas hier nicht näher eingegangen werden soll. Eine kausale Therapie zur Reduktion des Hirnödems, und konsekutiv, des sekundären Hirnschadens, existiert bisher nicht. Die Manuskripte liefern drei Ansatzpunkte für eine mögliche therapeutische Beeinflussung einzelner Komponenten der Pathophysiologie des sekundären posttraumatischen Hirnschadens, die bisher noch nicht in diesem Zusammenhang untersucht wurden.

Außerdem könnten die Erkenntnisse helfen, Patienten zu identifizieren, die möglicherweise einen besonders schweren Krankheitsverlauf nach Schädel-Hirn-Trauma erleiden könnten: Bisher gibt es lediglich einen bekannten (genetischen) Risikofaktor, der mit einem schweren Krankheitsverlauf sowie einer verlangsamten Erholung nach SHT in Zusammenhang gebracht wird: das Vorliegen des ApoE4-Allels (Alexander et al., 2007; Zhou et al., 2008). Die migraine-assoziierten S218L- und R192Q-Mutationen sind zwar in der Bevölkerung relativ selten, Ca<sub>v</sub>2.1-Mutationen könnten jedoch auch in Zusammenhang mit einfacher Migraine stehen und deswegen einen weitaus größeren Patientenkreis betreffen (May et al., 1995; Nyholt et al., 1998; Terwindt et al., 2001).

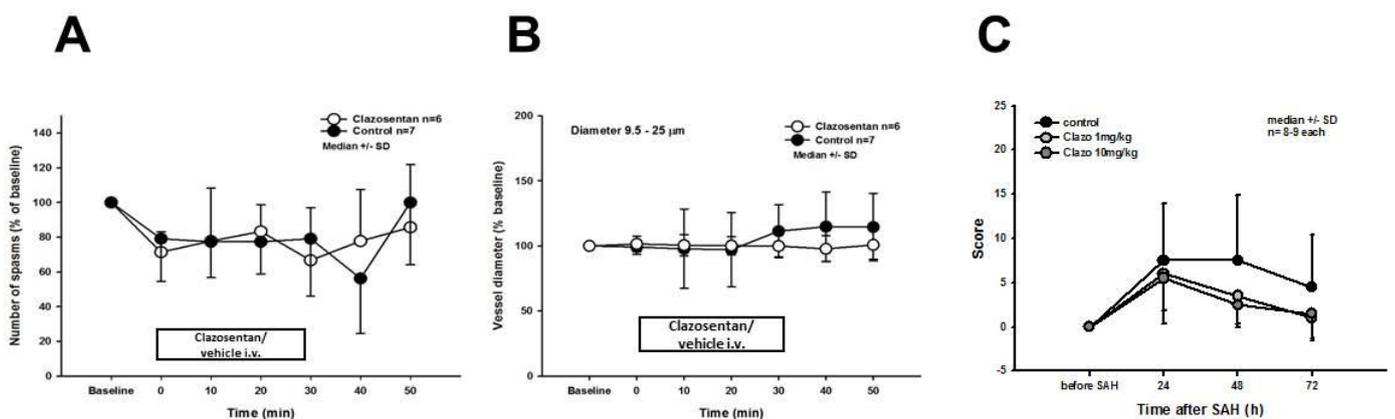
### 4.3 Rolle von Endothelin-1a Rezeptoren für die frühe Mikrozirkulationsstörung nach Subarachnoidalblutung

#### 4.3.1 Manuskript 10

Die Ursachen der frühen Mikrozirkulationsstörung nach Subarachnoidalblutung sind bisher nicht abschließend geklärt. Wir konnten in der Vergangenheit zeigen, dass es bereits kurz nach SAB zu lang anhaltenden mikroarteriellen Verengungen und Mikrovasospasmen kommt (Friedrich et al., 2012), und dass eine Reduktion der Mikrovasospasmen mit einer signifikanten Verbesserung des posthämorrhagischen Outcome einhergeht (Manuskript 4) (Terpolilli et al., 2016). Obwohl die NO-

Inhalation zu einer signifikanten Reduktion der Spasmen führt, lassen sich auch unter iNO residuale Spasmen und arterioläre Verengungen nachweisen, sodass neben einer lokalen NO-Depletion weitere Pathomechanismen beteiligt sein müssen. Eine Möglichkeit ist die gesteigerte Produktion von vasokonstriktiven Substanzen. Endothelin-1 ist ein starker endogener Vasokonstriktor, der nach SAB vermehrt produziert und freigesetzt wird (Hansen-Schwartz et al., 2003; Isotani et al., 1996; Lei et al., 2015) und der in Zusammenhang mit verzögert auftretenden Spasmen der Circulus willisii-Gefäße gebracht wird (Armstead, 1996; Juvela, 2002; Lin et al., 2004). Die ET-1-Konzentration ist nach Subarachnoidalblutung sowohl bei Patienten (Juvela, 2002) als auch bei Versuchstiere (Lei et al., 2015) erhöht, in einigen Studien bereits nach 30 Minuten (Josko et al., 2000); die vasokonstriktive Wirkung von ET-1 wird nach SAB hauptsächlich über den ET<sub>1A</sub>-Rezeptor (ET<sub>A</sub>R) (Salom et al., 1995; Schilling et al., 1995). Eine Hemmung der Endothelin-1<sub>A</sub> Rezeptoren mit dem potenten Inhibitor Clazosentan verhindert diesen verzögert auftretenden Makrovasospasmus nahezu komplett (Macdonald et al., 2008; Macdonald et al., 2011; Vatter et al., 2005a; Vatter et al., 2005b). Ob Endothelin auch eine Rolle beim Mikrovasospasmus spielen könnte ist jedoch unbekannt.

In unserer Studie bewirkte die Gabe des ET<sub>A</sub>R-Blockers Clazosentan keine Änderung von Zahl und Schwere der Mikrovasospasmen (**Abbildung 22A**) oder der mikroarteriolen Verengung nach experimenteller SAB (**Abbildung 22B**). Ein Effekt auf das neurologische Outcome über 3 Tage ließ sich ebenfalls nicht feststellen (**Abbildung 22C**). Endothelin-1<sub>A</sub>-Rezeptoren scheinen also nicht in relevantem Ausmaß an der Formierung von Mikrovasospasmen oder am posthämorrhagischen early brain injury beteiligt zu sein. Die Ergebnisse dieser Untersuchung untermauern auch eine weitere Hypothese zur Pathophysiologie nach Subarachnoidalblutung, nämlich die, dass nicht die angiographisch nachweisbaren, verzögert auftretenden Vasospasmen die Prognose der Patienten



**Abbildung 22.** Effekt der Endothelin-1<sub>A</sub>-Rezeptorblockade durch Clazosentan auf die Mikrozirkulation nach experimenteller SAB. A. Drei Stunden nach SAB zeigen sich ausgeprägte MVS. Die 30-minütige Clazosentan-Gabe hat keinen Effekt auf die Anzahl der Spasmen. B. Der Durchmesser zerebraler Arteriolen (Durchmesser 9.5-25

µm) bleibt ebenfalls unverändert. C. Auch die längerfristige Clazosentan-Therapie über 24 Stunden zeigt keinen Einfluss auf das neurologische Outcome.

bestimmen, sondern die Vorgänge in der Mikrozirkulation, der als early brain injury zusammengefasst werden (Cahill et al., 2006; Fujii et al., 2013; Ostrowski et al., 2006; Sabri et al., 2013; Sehba et al., 2012). Die Ergebnisse der klinischen Studien zu Clazosentan hatten gezeigt, dass der verzögert auftretende, angiographisch nachweisbare posthämorrhagische Vasospasmus der Circulus willisii Gefäße durch das Medikament nahezu vollständig aufgehoben werden kann. Dennoch zeigte sich keine signifikante Reduktion ischämischer Veränderungen und auch keine Verbesserung der neurologischen Outcome (Macdonald et al., 2011). In der vorliegenden Studie konnten wir nun direkt zeigen, dass ET<sub>A</sub>R-Blockade keinen Einfluss auf die Gefäße der Mikrozirkulation hat, was einerseits eine mögliche Erklärung für die negativen Ergebnisse der klinischen Studien liefert und zudem nahelegt, dass Spasmen der Mikrogefäße durch andere Mechanismen verursacht werden als Spasmen der größeren zerebralen Gefäße.

#### 4.3.2 Zusammenfassung und Beurteilung der Manuskripte 4 und 10

Beide Manuskripte beschäftigen sich mit der Pathogenese und den Mechanismen des früh nach Subarachnoidalblutung auftretenden Mikrovasospasmus. Dieser wurde von unserer Klinik erstmalig beschrieben, zunächst in Patienten (Uhl et al., 2003), später systematisch im Mausmodell der SAB (Friedrich et al., 2012) nachgewiesen; er gehört zu einer Reihe weiterer Pathomechanismen, die insgesamt zu einer ausgeprägten Störung der Mikrozirkulation und somit früh zur Minderperfusion und Schädigung des Hirnparenchyms führen (sog. early brain injury, EBI); in der Diagnostik sind die durch EBI verursachten Parenchymschäden oft erst mit Verzögerung als ischämische Areale (sog. delayed cerebral ischemia, DCI) sichtbar. Man geht inzwischen davon aus, dass EBI das Gewebeüberleben, die Entstehung der DCI und somit die neurologische Prognose des Patienten maßgeblich bestimmt (Cahill et al., 2006; Fujii et al., 2013; Ostrowski et al., 2006; Sabri et al., 2013; Sehba et al., 2012). Verzögert (d. h. nach mehreren Tagen) auftretende Spasmen der größeren zerebralen Gefäße, die in Doppler-Sonographie und Angiographie nachgewiesen werden können und die man lange für die ausschlaggebende Ursache von DCI hielt, scheinen nur eine nachgeordnete Rolle zu spielen (Ayling et al., 2016; Macdonald et al., 2007; Terpolilli et al., 2015). Die genauen Mechanismen des EBI sind bisher noch nicht abschließend geklärt, relevante Phänomene sind neben Mikrovasospasmen (Terpolilli et al., 2015) unter anderem die Formierung von Mikrothrombosen (Sabri et al., 2012; Sehba et al., 2005), Leukozyten-Endothel-Interaktionen (Tso et al., 2013), ein (lokaler) Mangel an Stickstoff-Monoxid (Sehba et al., 2000), apoptotische Mechanismen (Hasegawa et al., 2011) und inflammatorische Vorgänge (Zheng et al., 2017).

Bisher ist unklar, wie und warum Mikrovasospasmen, die im Verlauf auch von anderen Gruppen nachgewiesen wurden (Pennings et al., 2004; Pennings et al., 2009; Sun et al., 2009), entstehen und welche Relevanz sie für die neurologische Prognose nach SAB sie haben. Ausgehend von der Kenntnis über die Mechanismen des verzögert auftretenden Spasmus wurden folgende Möglichkeiten in Betracht gezogen, die hauptsächlich Folge des subarachnoidalen Blutaustritts mit Freiwerden von Hämoglobin sind: Vasokonstriktion aufgrund eines Mangels an Vasodilatoren (insbesondere NO), aufgrund eines Überschusses an Vasokonstriktoren, aufgrund direkter Gefäßschädigung (z. B. durch freie Sauerstoffradikale) oder aufgrund verringerter Vasomotilität bei perivaskulären Nervenschäden (Kolias et al., 2009).

Ein sehr früher Abfall der NO-Konzentration nach SAB konnte bereits vor Längerem experimentell nachgewiesen werden (Sehba et al., 2000; Sehba et al., 2011a) und wurde in Zusammenhang mit dem akuten posthämorrhagischen Durchblutungsabfall gebracht (Schwartz et al., 2000; Sun et al., 2003). In Manuskript 4 wird direkt durch in vivo Mikroskopie nachgewiesen, dass die Zuführung von NO rasch zu einer Verringerung der mikrovaskulären Konstriktion und einer drastischen Reduktion der Zahl der Mikrovasospasmen führt, womit sich eine klare Kausalität bestätigt. Zudem wird klar ein Zusammenhang zwischen einer Verbesserung der Perfusion der Mikrozirkulation und einem gebesserten Outcome gezeigt. Zur Untersuchung der zweiten Hypothese, die eines Überschusses von Vasokonstriktoren als Ursache für MVS, wurde in der Folge Endothelin-1, ein sehr starker Vasokonstriktor, dessen Konzentration nach SAB bereits früh ansteigt und dessen Gefäß-Wirkung nach SAB potenziert wird, untersucht. Ein Effekt auf zerebrale Mikrogefäße konnte jedoch nicht nachgewiesen werden, was konsistent mit Ergebnissen anderer Gruppen ist, die bei anderen Faktoren des EBI (u. a. Mikrothrombosen (Pisapia et al., 2012)) ebenfalls keinen Einfluss der Endothelin-Rezeptor-Blockade feststellen konnten.

Die Ergebnisse der Antragstellerin helfen also einerseits dabei, die Mechanismen der Mikrovasospasmen-Bildung besser zu verstehen und – im Fall der NO-Depletion – ggf. sogar therapeutisch zu nutzen (NO-Inhalation); andererseits erweist sich in Manuskript 10 die Hypothese, dass Spasmen in zerebralen Mikrogefäßen den gleichen Mechanismen unterliegen wie die gut erforschten Spät-Vasospasmen, als falsch. Somit ergibt sich ein deutlicher Erkenntnisgewinn über den posthämorrhagischen Mikrovasospasmus nach Subarachnoidalblutung.

## 5. Abschließende Zusammenfassung und Ausblick

Im Rahmen des vorliegenden Habitationsprojekts konnten die Rolle des NO-Stoffwechsels nach zerebralen Insulten sowie verschiedene molekulare Mechanismen der Hirnödeme-Entstehung nach Schädel-Hirn-Trauma genauer aufgeklärt werden. Mit der NO-Inhalation sowie der NOS-Hemmung mit Tetrahydrobiopterin-Analoga wurden zudem zwei vielversprechende Therapieansätze erfolgreich experimentell untersucht, die sich aufgrund der gewonnenen Ergebnisse nun in der klinischen Erprobung befinden.

Zu diesem Themenkomplex wurden von der Antragstellerin 7 Arbeiten als verantwortlicher Autor publiziert, bei 6 Arbeiten ist die Antragstellerin Koautorin. Insgesamt hat die Antragstellerin bisher 8 Arbeiten sowie 2 Übersichtsartikel als Erstautorin sowie 8 Arbeiten als Koautorin veröffentlicht.

## 6. Literaturverzeichnis

ABBOTT,N.J. (2000). Inflammatory mediators and modulation of blood-brain barrier permeability. *Cell Mol. Neurobiol.* **20**, 131-147.

ADAMS,J.H., GRAHAM,D.I., and GENNARELLI,T.A. (1983). Head injury in man and experimental animals: neuropathology. *Acta Neurochir. Suppl (Wien. )* **32**, 15-30.

ADAMS,J.H., SCOTT,G., PARKER,L.S., GRAHAM,D.I., and DOYLE,D. (1980). The contusion index: a quantitative approach to cerebral contusions in head injury. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* **6**, 319-324.

ADRIE,C., BLOCH,K.D., MORENO,P.R., et al. (1996). Inhaled nitric oxide increases coronary artery patency after thrombolysis. *Circulation* **94**, 1919-1926.

ALBERT-WEISSENBERGER,C., SIREN,A.L., and KLEINSCHNITZ,C. (2013). Ischemic stroke and traumatic brain injury: the role of the kallikrein-kinin system. *Prog. Neurobiol.* **101-102**, 65-82.

ALEXANDER,S., KERR,M.E., KIM,Y., KAMBOH,M.I., BEERS,S.R., and CONLEY,Y.P. (2007). Apolipoprotein E4 allele presence and functional outcome after severe traumatic brain injury. *J Neurotrauma* **24**, 790-797.

ALVAREZ,G., COX,P., PAIROA,M., GARCIA,M., DELGADO,I., and LAVADOS,P.M. (2010). Incidence of subarachnoid haemorrhage in the Aconcagua Valley, Chile: a community-based, prospective surveillance project. *J Neurol. Neurosurg. Psychiatry* **81**, 778-782.

ARMSTEAD,W.M. (1996). Role of endothelin in pial artery vasoconstriction and altered responses to vasopressin after brain injury. *J. Neurosurg.* **85**, 901-907.

ASTRUP,J., SIESJO,B.K., and SYMON,L. (1981). Thresholds in cerebral ischemia - the ischemic penumbra. *Stroke* **12**, 723-725.

AYATA,C. and LAURITZEN,M. (2015). Spreading Depression, Spreading Depolarizations, and the Cerebral Vasculature. *Physiol Rev.* **95**, 953-993.

AYLING,O.G., IBRAHIM,G.M., ALOTAIBI,N.M., GOODERHAM,P.A., and MACDONALD,R.L. (2016). Dissociation of Early and Delayed Cerebral Infarction After Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage. *Stroke* **47**, 2945-2951.

BAETHMANN,A., MAIER-HAUFF,K., KEMPSKI,O., UNTERBERG,A., WAHL,M., and SCHURER,L. (1988). Mediators of brain edema and secondary brain damage. *Crit Care Med.* **16**, 972-978.

BAETHMANN,A., MAIER-HAUFF,K., SCHURER,L., et al. (1989). Release of glutamate and of free fatty acids in vasogenic brain edema. *J. Neurosurg.* **70**, 578-591.

BARKER-COLLO,S.L. and FEIGIN,V.L. (2009). Capturing the spectrum: suggested standards for conducting population-based traumatic brain injury incidence studies. *Neuroepidemiology.* **32**, 1-3.

BARRETT,C.F., VAN DEN MAAGDENBERG,A.M., FRANTS,R.R., and FERRARI,M.D. (2008). Familial hemiplegic migraine. *Adv. Genet.* **63**, 57-83.

BARTON,C.W., HEMPHILL,J.C., MORABITO,D., and MANLEY,G. (2005). A novel method of evaluating the impact of secondary brain insults on functional outcomes in traumatic brain-injured patients. *Acad. Emerg. Med* **12**, 1-6.

BARZO,P., MARMAROU,A., FATOUROS,P., HAYASAKI,K., and CORWIN,F. (1997). Contribution of vasogenic and cellular edema to traumatic brain swelling measured by diffusion-weighted imaging. *J. Neurosurg.* **87**, 900-907.

BATH,P.M., KRISHNAN,K., and APPLETON,J.P. (2017). Nitric oxide donors (nitrates), L-arginine, or nitric oxide synthase inhibitors for acute stroke. *Cochrane. Database. Syst. Rev.* **4**, CD000398.

BAYIR,H., CLARK,R.S., and KOCHANEK,P.M. (2003). Promising strategies to minimize secondary brain injury after head trauma. *Crit Care Med.* **31**, S112-S117.

BEDERSON,J.B., GERMANO,I.M., and GUARINO,L. (1995). Cortical blood flow and cerebral perfusion pressure in a new noncraniotomy model of subarachnoid hemorrhage in the rat. *Stroke* **26**, 1086-1091.

BEDERSON,J.B., LEVY,A.L., DING,W.H., et al. (1998). Acute vasoconstriction after subarachnoid hemorrhage. *Neurosurgery* **42**, 352-360.

BERRA,L.V., CARCERERI,D.P., SUZUKI,H., and PASQUALIN,A. (2007). The role of constitutive and inducible nitric oxide synthase in the human brain after subarachnoid hemorrhage. *J. Neurosurg. Sci.* **51**, 1-9.

BERTRAND,M.J., MILUTINOVIC,S., DICKSON,K.M., et al. (2008). cIAP1 and cIAP2 facilitate cancer cell survival by functioning as E3 ligases that promote RIP1 ubiquitination. *Mol. Cell* **30**, 689-700.

BEVERS,L.M., BRAAM,B., POST,J.A., et al. (2006). Tetrahydrobiopterin, but not L-arginine, decreases NO synthase uncoupling in cells expressing high levels of endothelial NO synthase. *Hypertension* **47**, 87-94.

BIGNELL,G.R., WARREN,W., SEAL,S., et al. (2000). Identification of the familial cylindromatosis tumour-suppressor gene. *Nat. Genet.* **25**, 160-165.

BOWYER,S.M., AURORA,K.S., MORAN,J.E., TEPLEY,N., and WELCH,K.M. (2001). Magnetoencephalographic fields from patients with spontaneous and induced migraine aura. *Ann. Neurol.* **50**, 582-587.

BRINTON,R.E., GEE,K.W., WAMSLEY,J.K., DAVIS,T.P., and YAMAMURA,H.I. (1984). Regional distribution of putative vasopressin receptors in rat brain and pituitary by quantitative autoradiography. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **81**, 7248-7252.

BUIJS,R.M. (1978). Intra- and extrahypothalamic vasopressin and oxytocin pathways in the rat. Pathways to the limbic system, medulla oblongata and spinal cord. *Cell Tissue Res.* **192**, 423-435.

BUKI,A. and POVLISHOCK,J.T. (2006). All roads lead to disconnection?--Traumatic axonal injury revisited. *Acta Neurochir. (Wien.)* **148**, 181-193.

CAHILL,J., CALVERT,J.W., and ZHANG,J.H. (2006). Mechanisms of early brain injury after subarachnoid hemorrhage. *J Cereb. Blood Flow Metab* **26**, 1341-1353.

CARNEY,N., TOTTEN,A.M., O'REILLY,C., et al. (2017). Guidelines for the Management of Severe Traumatic Brain Injury, Fourth Edition. *Neurosurgery* **80**, 6-15.

CHASE,A. (2014). Traumatic brain injury: Spreading depolarization can cause secondary injury after TBI. *Nat. Rev. Neurol.* **10**, 547.

CHERIAN,L., CHACKO,G., GOODMAN,J.C., and ROBERTSON,C.S. (1999). Cerebral hemodynamic effects of phenylephrine and L-arginine after cortical impact injury. *Crit Care Med.* **27**, 2512-2517.

CHERIAN,L., GOODMAN,J.C., and ROBERTSON,C.S. (2000). Brain nitric oxide changes after controlled cortical impact injury in rats. *J. Neurophysiol.* **83**, 2171-2178.

CHERIAN,L., HLATKY,R., and ROBERTSON,C.S. (2004). Nitric oxide in traumatic brain injury. *Brain Pathol.* **14**, 195-201.

CHERIAN,L. and ROBERTSON,C.S. (2003). L-arginine and free radical scavengers increase cerebral blood flow and brain tissue nitric oxide concentrations after controlled cortical impact injury in rats. *J. Neurotrauma* **20**, 77-85.

CHESNUT,R.M., MARSHALL,L.F., KLAUBER,M.R., et al. (1993). The role of secondary brain injury in determining outcome from severe head injury. *J. Trauma* **34**, 216-222.

CHOLET,N., SEYLAZ,J., LACOMBE,P., and BONVENTO,G. (1997). Local uncoupling of the cerebrovascular and metabolic responses to somatosensory stimulation after neuronal nitric oxide synthase inhibition. *J. Cereb. Blood Flow Metab* **17**, 1191-1201.

CLOWER,B.R., YAMAMOTO,Y., CAIN,L., HAINES,D.E., and SMITH,R.R. (1994). Endothelial injury following experimental subarachnoid hemorrhage in rats: effects on brain blood flow. *Anat. Rec.* **240**, 104-114.

CONNOLLY,E.S., JR., RABINSTEIN,A.A., CARHUAPOMA,J.R., et al. (2012). Guidelines for the management of aneurysmal subarachnoid hemorrhage: a guideline for healthcare professionals from the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke* **43**, 1711-1737.

CSERR,H.F. and LATZKOVITS,L. (1992). A role for centrally-released vasopressin in brain ion and volume regulation: a hypothesis. *Prog. Brain Res.* **91**, 3-6.

DALKARA,T. and MOSKOWITZ,M.A. (1994). The complex role of nitric oxide in the pathophysiology of focal cerebral ischemia. *Brain Pathol.* **4**, 49-57.

DE ROOIJ,N.K., LINN,F.H., VAN DER PLAS,J.A., ALGRA,A., and RINKEL,G.J. (2007). Incidence of subarachnoid haemorrhage: a systematic review with emphasis on region, age, gender and time trends. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* **78**, 1365-1372.

DEBIAIS,S., HOMMET,C., BONNAUD,I., et al. (2009). The FHM1 mutation S218L: a severe clinical phenotype? A case report and review of the literature. *Cephalgia* **29**, 1337-1339.

DEPASQUALE,M., PATLAK,C.S., and CSERR,H.F. (1989). Brain ion and volume regulation during acute hypernatremia in Brattleboro rats. *Am. J. Physiol* **256**, F1059-F1066.

DEWITT,D.S., JENKINS,L.W., WEI,E.P., LUTZ,H., BECKER,D.P., and KONTOS,H.A. (1986). Effects of fluid-percussion brain injury on regional cerebral blood flow and pial arteriolar diameter. *J. Neurosurg.* **64**, 787-794.

DEWITT,D.S. and PROUGH,D.S. (2003). Traumatic cerebral vascular injury: the effects of concussive brain injury on the cerebral vasculature. *J. Neurotrauma* **20**, 795-825.

DOCZI,T. (1993). Volume regulation of the brain tissue--a survey. *Acta Neurochir. (Wien.)* **121**, 1-8.

DODEL,R., WINTER,Y., RINGEL,F., et al. (2010). Cost of illness in subarachnoid hemorrhage: a German longitudinal study. *Stroke* **41**, 2918-2923.

DONKIN,J.J. and VINK,R. (2010). Mechanisms of cerebral edema in traumatic brain injury: therapeutic developments. *Curr. Opin. Neurol.* **23**, 293-299.

DREIER,J.P., KORNER,K., EBERT,N., et al. (1998). Nitric oxide scavenging by hemoglobin or nitric oxide synthase inhibition by N-nitro-L-arginine induces cortical spreading ischemia when K<sup>+</sup> is increased in the subarachnoid space. *J. Cereb. Blood Flow Metab* **18**, 978-990.

DUPUY,P.M., SHORE,S.A., DRAZEN,J.M., FROSTELL,C., HILL,W.A., and ZAPOL,W.M. (1992). Bronchodilator action of inhaled nitric oxide in guinea pigs. *J Clin. Invest* **90**, 421-428.

FARACI,F.M. and BRIAN,J.E., JR. (1994). Nitric oxide and the cerebral circulation. *Stroke* **25**, 692-703.

FARACI,F.M., MAYHAN,W.G., FARRELL,W.J., and HEISTAD,D.D. (1988). Humoral regulation of blood flow to choroid plexus: role of arginine vasopressin. *Circ. Res.* **63**, 373-379.

FERRARI,M.D. (1998). Migraine. *Lancet* **351**, 1043-1051.

FILEP,J.G., FOLDES-FILEP,E., and SIROIS,P. (1993). Nitric oxide modulates vascular permeability in the rat coronary circulation. *Br. J. Pharmacol.* **108**, 323-326.

FOLEY,L.M., HITCHENS,T.K., MELICK,J.A., BAYIR,H., HO,C., and KOCHANNEK,P.M. (2008). Effect of inducible nitric oxide synthase on cerebral blood flow after experimental traumatic brain injury in mice. *J Neurotrauma* **25**, 299-310.

FORMAN,L.J., LIU,P., NAGELE,R.G., YIN,K., and WONG,P.Y. (1998). Augmentation of nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite production during cerebral ischemia and reperfusion in the rat. *Neurochem. Res.* **23**, 141-148.

FOX-ROBICHAUD,A., PAYNE,D., HASAN,S.U., et al. (1998). Inhaled NO as a viable antiadhesive therapy for ischemia/reperfusion injury of distal microvascular beds. *J. Clin. Invest* **101**, 2497-2505.

FRATACCI,M.D., FROSTELL,C.G., CHEN,T.Y., WAIN,J.C., JR., ROBINSON,D.R., and ZAPOL,W.M. (1991). Inhaled nitric oxide. A selective pulmonary vasodilator of heparin-protamine vasoconstriction in sheep. *Anesthesiology* **75**, 990-999.

FRIEDRICH,B., MULLER,F., FEILER,S., SCHOLLER,K., and PLESNILA,N. (2012). Experimental subarachnoid hemorrhage causes early and long-lasting microarterial constriction and microthrombosis: an in-vivo microscopy study. *J Cereb. Blood Flow Metab* **32**, 447-455.

FROSTELL,C., FRATACCI,M.D., WAIN,J.C., JONES,R., and ZAPOL,W.M. (1991). Inhaled nitric oxide. A selective pulmonary vasodilator reversing hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Circulation* **83**, 2038-2047.

FROSTELL,C.G., BLOMQVIST,H., HEDENSTIERNA,G., LUNDBERG,J., and ZAPOL,W.M. (1993). Inhaled nitric oxide selectively reverses human hypoxic pulmonary vasoconstriction without causing systemic vasodilation. *Anesthesiology* **78**, 427-435.

FUJII,M., YAN,J., ROLLAND,W.B., SOEJIMA,Y., CANER,B., and ZHANG,J.H. (2013). Early brain injury, an evolving frontier in subarachnoid hemorrhage research. *Transl. Stroke Res.* **4**, 432-446.

GAHM,C., HOLMIN,S., and MATHIESEN,T. (2000). Temporal profiles and cellular sources of three nitric oxide synthase isoforms in the brain after experimental contusion. *Neurosurgery* **46**, 169-177.

GAHM,C., HOLMIN,S., WIKLUND,P.N., BRUNDIN,L., and MATHIESEN,T. (2006). Neuroprotection by selective inhibition of inducible nitric oxide synthase after experimental brain contusion. *J. Neurotrauma* **23**, 1343-1354.

GARNETT,M.R., BLAMIRE,A.M., CORKILL,R.G., et al. (2001). Abnormal cerebral blood volume in regions of contused and normal appearing brain following traumatic brain injury using perfusion magnetic resonance imaging. *J. Neurotrauma.* **18**, 585-593.

GARRY,P.S., EZRA,M., ROWLAND,M.J., WESTBROOK,J., and PATTINSON,K.T. (2015). The role of the nitric oxide pathway in brain injury and its treatment--from bench to bedside. *Exp. Neurol.* **263**, 235-243.

GRECO,R., AMANTEA,D., BLANDINI,F., et al. (2007). Neuroprotective effect of nitroglycerin in a rodent model of ischemic stroke: evaluation of Bcl-2 expression. *Int Rev. Neurobiol.* **82**, 423-435.

GURSOY-OZDEMIR,Y., QIU,J., MATSUOKA,N., et al. (2004). Cortical spreading depression activates and upregulates MMP-9. *J. Clin. Invest* **113**, 1447-1455.

HACKETT,M.L. and ANDERSON,C.S. (2000). Health outcomes 1 year after subarachnoid hemorrhage: An international population-based study. The Australian Cooperative Research on Subarachnoid Hemorrhage Study Group. *Neurology* **55**, 658-662.

HAKIM,A.M. (1987). The cerebral ischemic penumbra. *Can. J. Neurol. Sci.* **14**, 557-559.

HALL,E.D. (1989). Free radicals and CNS injury. *Crit Care Clin.* **5**, 793-805.

HANGGI,D. and STEIGER,H.J. (2006). Nitric oxide in subarachnoid haemorrhage and its therapeutics implications. *Acta Neurochir. (Wien.)* **148**, 605-613.

HANSEN-SCHWARTZ,J., HOEL,N.L., ZHOU,M., XU,C.B., SVENDGAARD,N.A., and EDVINSSON,L. (2003). Subarachnoid hemorrhage enhances endothelin receptor expression and function in rat cerebral arteries. *Neurosurgery* **52**, 1188-1194.

HARTINGS,J.A., WILSON,J.A., HINZMAN,J.M., et al. (2014). Spreading depression in continuous electroencephalography of brain trauma. *Ann. Neurol.* **76**, 681-694.

HASEGAWA,Y., SUZUKI,H., SOZEN,T., ALTAY,O., and ZHANG,J.H. (2011). Apoptotic mechanisms for neuronal cells in early brain injury after subarachnoid hemorrhage. *Acta Neurochir. Suppl* **110**, 43-48.

HATAKE,K., WAKABAYASHI,I., KAKISHITA,E., and HISHIDA,S. (1992). Impairment of endothelium-dependent relaxation in human basilar artery after subarachnoid hemorrhage. *Stroke* **23**, 1111-1116.

HILLMAN,N.D., CHEIFETZ,I.M., CRAIG,D.M., SMITH,P.K., UNGERLEIDER,R.M., and MELIONES,J.N. (1997). Inhaled nitric oxide, right ventricular efficiency, and pulmonary vascular mechanics: selective vasodilation of small pulmonary vessels during hypoxic pulmonary vasoconstriction. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* **113**, 1006-1013.

HLATKY,R., FURUYA,Y., VALADKA,A.B., GOODMAN,J.C., and ROBERTSON,C.S. (2002). Comparison of microdialysate arginine and glutamate levels in severely head-injured patient. *Acta Neurochir. Suppl* **81**, 347-349.

HLATKY,R., LUI,H., CHERIAN,L., et al. (2003). The role of endothelial nitric oxide synthase in the cerebral hemodynamics after controlled cortical impact injury in mice. *J. Neurotrauma* **20**, 995-1006.

HOFFMANN,U., SHENG,H., AYATA,C., and WARNER,D.S. (2016). Anesthesia in Experimental Stroke Research. *Transl. Stroke Res.* **7**, 358-367.

HONDA,M., SASE,S., YOKOTA,K., et al. (2012). Early cerebral circulatory disturbance in patients suffering subarachnoid hemorrhage prior to the delayed cerebral vasospasm stage: xenon computed tomography and perfusion computed tomography study. *Neurol. Med. Chir (Tokyo)* **52**, 488-494.

HUANG,J. and VAN GELDER,J.M. (2002). The probability of sudden death from rupture of intracranial aneurysms: a meta-analysis. *Neurosurgery* **51**, 1101-1105.

HUANG,Z., HUANG,P.L., MA,J., et al. (1996). Enlarged infarcts in endothelial nitric oxide synthase knockout mice are attenuated by nitro-L-arginine. *J. Cereb. Blood Flow Metab* **16**, 981-987.

HUDETZ,A.G., CONGER,K.A., EKE,A., and HALSEY,J.H., JR. (1993). A mathematical model of the intracerebral steal phenomenon in regional and focal ischaemia. *Neurol. Res.* **15**, 117-127.

IADECOLA,C., PELLIGRINO,D.A., MOSKOWITZ,M.A., and LASSEN,N.A. (1994). Nitric oxide synthase inhibition and cerebrovascular regulation. *J. Cereb. Blood Flow Metab* **14**, 175-192.

IADECOLA,C., ZHANG,F., CASEY,R., CLARK,H.B., and ROSS,M.E. (1996). Inducible nitric oxide synthase gene expression in vascular cells after transient focal cerebral ischemia. *Stroke* **27**, 1373-1380.

IADECOLA,C., ZHANG,F., XU,S., CASEY,R., and ROSS,M.E. (1995a). Inducible nitric oxide synthase gene expression in brain following cerebral ischemia. *J. Cereb. Blood Flow Metab* **15**, 378-384.

IADECOLA,C., ZHANG,F., and XU,X. (1995b). Inhibition of inducible nitric oxide synthase ameliorates cerebral ischemic damage. *Am. J. Physiol* **268**, R286-R292.

INGALL,T., ASPLUND,K., MAHONEN,M., and BONITA,R. (2000). A multinational comparison of subarachnoid hemorrhage epidemiology in the WHO MONICA stroke study. *Stroke* **31**, 1054-1061.

ISOTANI,E., AZUMA,H., SUZUKI,R., HAMASAKI,H., SATO,J., and HIRAKAWA,K. (1996). Impaired endothelium-dependent relaxation in rabbit pulmonary artery after subarachnoid hemorrhage. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **28**, 639-644.

ITO,J., MARMAROU,A., BARZO,P., FATOUROS,P., and CORWIN,F. (1996). Characterization of edema by diffusion-weighted imaging in experimental traumatic brain injury. *J. Neurosurg.* **84**, 97-103.

JACOBSEN,K.R., FAUERBY,N., RAIDA,Z., et al. (2013). Effects of buprenorphine and meloxicam analgesia on induced cerebral ischemia in C57BL/6 male mice. *Comp Med.* **63**, 105-113.

JAFARIAN-TEHRANI,M., LOUIN,G., ROYO,N.C., et al. (2005). 1400W, a potent selective inducible NOS inhibitor, improves histopathological outcome following traumatic brain injury in rats. *Nitric. Oxide.* **12**, 61-69.

JAKUBOWSKI,J., BELL,B.A., SYMON,L., ZAWIRSKI,M.B., and FRANCIS,D.M. (1982). A primate model of subarachnoid hemorrhage: change in regional cerebral blood flow, autoregulation carbon dioxide reactivity, and central conduction time. *Stroke* **13**, 601-611.

JIANG,M.H., KAKU,T., HADA,J., and HAYASHI,Y. (2002). Different effects of eNOS and nNOS inhibition on transient forebrain ischemia. *Brain Res.* **946**, 139-147.

JOHNSTON,S.C., SELVIN,S., and GRESS,D.R. (1998). The burden, trends, and demographics of mortality from subarachnoid hemorrhage. *Neurology* **50**, 1413-1418.

JOSKO,J., HENDRYK,S., JEDRZEJOWSKA-SZYPULKA,H., et al. (2000). Effect of endothelin-1 receptor antagonist BQ-123 on basilar artery diameter after subarachnoid hemorrhage (SAH) in rats. *J. Physiol Pharmacol.* **51**, 241-249.

JUVELA,S. (2002). Plasma endothelin and big endothelin concentrations and serum endothelin-converting enzyme activity following aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *J. Neurosurg.* **97**, 1287-1293.

KADER,A., FRAZZINI,V.I., SOLOMON,R.A., and TRIFILETTI,R.R. (1993). Nitric oxide production during focal cerebral ischemia in rats. *Stroke* **24**, 1709-1716.

KASSELL,N.F., SASAKI,T., COLOHAN,A.R., and NAZAR,G. (1985). Cerebral vasospasm following aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Stroke* **16**, 562-572.

KELLY,D.F., KORDESTANI,R.K., MARTIN,N.A., et al. (1996). Hyperemia following traumatic brain injury: relationship to intracranial hypertension and outcome. *J. Neurosurg.* **85**, 762-771.

KIM,J., KEMP,S., KULLAS,K., HITOS,K., and DEXTER,M.A. (2013). Injury patterns in patients who "talk and die". *J. Clin. Neurosci.* **20**, 1697-1701.

KLATZO,I. (1987). Pathophysiological aspects of brain edema. *Acta Neuropathol.* **72**, 236-239.

KLEINDIENST,A., FAZZINA,G., DUNBAR,J.G., GLISSON,R., and MARMAROU,A. (2006). Protective effect of the V1a receptor antagonist SR49059 on brain edema formation following middle cerebral artery occlusion in the rat. *Acta Neurochir. Suppl* **96**, 303-306.

KOLIAS,A.G., SEN,J., and BELLI,A. (2009). Pathogenesis of cerebral vasospasm following aneurysmal subarachnoid hemorrhage: putative mechanisms and novel approaches. *J. Neurosci. Res.* **87**, 1-11.

KORS,E.E., TERWINDT,G.M., VERMEULEN,F.L., et al. (2001). Delayed cerebral edema and fatal coma after minor head trauma: role of the CACNA1A calcium channel subunit gene and relationship with familial hemiplegic migraine. *Ann. Neurol.* **49**, 753-760.

KOVALENKO,A., CHABLE-BESSIA,C., CANTARELLA,G., ISRAEL,A., WALLACH,D., and COURTOIS,G. (2003). The tumour suppressor CYLD negatively regulates NF-kappaB signalling by deubiquitination. *Nature* **424**, 801-805.

KRASUSKI,R.A., WARNER,J.J., WANG,A., HARRISON,J.K., TAPSON,V.F., and BASHORE,T.M. (2000). Inhaled nitric oxide selectively dilates pulmonary vasculature in adult patients with pulmonary hypertension, irrespective of etiology. *J. Am. Coll. Cardiol.* **36**, 2204-2211.

KUEBLER,W.M., KISCH-WEDEL,H., KEMMING,G.I., et al. (2003). Inhaled nitric oxide induces cerebrovascular effects in anesthetized pigs. *Neurosci. Lett.* **348**, 85-88.

KUNZ,M., NUSSBERGER,J., HOLTMANNSPOTTER,M., BITTERLING,H., PLESNILA,N., and ZAUSINGER,S. (2013). Bradykinin in blood and cerebrospinal fluid after acute cerebral lesions: correlations with cerebral edema and intracranial pressure. *J. Neurotrauma* **30**, 1638-1644.

LANDMESSER,U., DIKALOV,S., PRICE,S.R., et al. (2003). Oxidation of tetrahydrobiopterin leads to uncoupling of endothelial cell nitric oxide synthase in hypertension. *J. Clin. Invest* **111**, 1201-1209.

LATZKOVITS,L., CSERR,H.F., PARK,J.T., PATLAK,C.S., PETTIGREW,K.D., and RIMANOCZY,A. (1993). Effects of arginine vasopressin and atriopeptin on glial cell volume measured as 3-MG space. *Am. J. Physiol* **264**, C603-C608.

LEAO,A.A. (1944). Spreading depression of activity in the cerebral cortex. *J. Neurophysiol* **10**, 359-390.

LEAO,A. (1944). Spreading depression of activity in the cerebral cortex. *J. Neurophysiol* **7**, 359-390.

LEI,Q., LI,S., ZHENG,R., XU,K., and LI,S. (2015). Endothelin-1 expression and alterations of cerebral microcirculation after experimental subarachnoid hemorrhage. *Neuroradiology* **57**, 63-70.

LEVY,D., KUBES,P., and ZOCHODNE,D.W. (2001). Delayed peripheral nerve degeneration, regeneration, and pain in mice lacking inducible nitric oxide synthase. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **60**, 411-421.

LEWEN,A., MATZ,P., and CHAN,P.H. (2000). Free radical pathways in CNS injury. *J. Neurotrauma* **17**, 871-890.

LIN,C.L., JENG,A.Y., HOWNG,S.L., and KWAN,A.L. (2004). Endothelin and subarachnoid hemorrhage-induced cerebral vasospasm: pathogenesis and treatment. *Curr. Med. Chem.* **11**, 1779-1791.

LIU,H., GOODMAN,J.C., and ROBERTSON,C.S. (2002). The effects of L-arginine on cerebral hemodynamics after controlled cortical impact injury in the mouse. *J. Neurotrauma* **19**, 327-334.

LIU,H., LI,J., ZHAO,F., WANG,H., QU,Y., and MU,D. (2015). Nitric oxide synthase in hypoxic or ischemic brain injury. *Rev. Neurosci.* **26**, 105-117.

LIU,T., ZHAO,D.X., CUI,H., et al. (2016). Therapeutic hypothermia attenuates tissue damage and cytokine expression after traumatic brain injury by inhibiting necroptosis in the rat. *Sci. Rep.* **6**, 24547.

LO,E.H., HARA,H., ROGOWSKA,J., et al. (1996). Temporal correlation mapping analysis of the hemodynamic penumbra in mutant mice deficient in endothelial nitric oxide synthase gene expression. *Stroke* **27**, 1381-1385.

LOUIN,G., MARCHAND-VERRECCHIA,C., PALMIER,B., PLOTKINE,M., and JAFARIAN-TEHRANI,M. (2006). Selective inhibition of inducible nitric oxide synthase reduces neurological deficit but not cerebral edema following traumatic brain injury. *Neuropharmacology* **50**, 182-190.

MACDONALD,R.L., HIGASHIDA,R.T., KELLER,E., et al. (2011). Clazosentan, an endothelin receptor antagonist, in patients with aneurysmal subarachnoid haemorrhage undergoing surgical clipping: a randomised, double-blind, placebo-controlled phase 3 trial (CONSCIOUS-2). *Lancet Neurol.* **10**, 618-625.

MACDONALD,R.L., KASSELL,N.F., MAYER,S., et al. (2008). Clazosentan to overcome neurological ischemia and infarction occurring after subarachnoid hemorrhage (CONSCIOUS-1): randomized, double-blind, placebo-controlled phase 2 dose-finding trial. *Stroke* **39**, 3015-3021.

MACDONALD,R.L., PLUTA,R.M., and ZHANG,J.H. (2007). Cerebral vasospasm after subarachnoid hemorrhage: the emerging revolution. *Nat. Clin. Pract. Neurol.* **3**, 256-263.

MAEDA,T., KATAYAMA,Y., KAWAMATA,T., AOYAMA,N., and MORI,T. (1997). Hemodynamic depression and microthrombosis in the peripheral areas of cortical contusion in the rat: role of platelet activating factor. *Acta Neurochir. Suppl* **70**, 102-105.

MARMAROU,A., FATOUROS,P.P., BARZO,P., et al. (2000). Contribution of edema and cerebral blood volume to traumatic brain swelling in head-injured patients. *J. Neurosurg.* **93**, 183-193.

MARMAROU,A., SIGNORETTI,S., AYGOK,G., FATOUROS,P., and PORTELLA,G. (2006a). Traumatic brain edema in diffuse and focal injury: cellular or vasogenic? *Acta Neurochir. Suppl* **96**, 24-29.

MARMAROU,A., SIGNORETTI,S., FATOUROS,P.P., PORTELLA,G., AYGOK,G.A., and BULLOCK,M.R. (2006b). Predominance of cellular edema in traumatic brain swelling in patients with severe head injuries. *J. Neurosurg.* **104**, 720-730.

MARMAROU,C.R., LIANG,X., ABIDI,N.H., et al. (2014). Selective vasopressin-1a receptor antagonist prevents brain edema, reduces astrocytic cell swelling and GFAP, V1aR and AQP4 expression after focal traumatic brain injury. *Brain Res.* **1581**, 89-102.

MAY,A., OPHOFF,R.A., TERWINDT,G.M., et al. (1995). Familial hemiplegic migraine locus on 19p13 is involved in the common forms of migraine with and without aura. *Hum. Genet.* **96**, 604-608.

MAYER,S.A., KREITER,K.T., COPELAND,D., et al. (2002). Global and domain-specific cognitive impairment and outcome after subarachnoid hemorrhage. *Neurology* **59**, 1750-1758.

MAYEVSKY,A., DORON,A., MANOR,T., MEILIN,S., ZARCHIN,N., and OUAKNINE,G.E. (1996). Cortical spreading depression recorded from the human brain using a multiparametric monitoring system. *Brain Res.* **740**, 268-274.

MENDELOW,A.D. and TEASDALE,G.M. (1983). Pathophysiology of head injuries. *Br. J. Surg.* **70**, 641-650.

MEURS,K.P., RHINE,W.D., ASSELIN,J.M., and DURAND,D.J. (1997). Response of premature infants with severe respiratory failure to inhaled nitric oxide. *Preemie NO Collaborative Group. Pediatr. Pulmonol.* **24**, 319-323.

MILLIKAN,C.H. (1975). Cerebral vasospasm and ruptured intracranial aneurysm. *Arch. Neurol.* **32**, 433-449.

MORIKAWA,E., HUANG,Z., and MOSKOWITZ,M.A. (1992). L-arginine decreases infarct size caused by middle cerebral arterial occlusion in SHR. *Am. J. Physiol* **263**, H1632-H1635.

MORIKAWA,E., MOSKOWITZ,M.A., HUANG,Z., YOSHIDA,T., IRIKURA,K., and DALKARA,T. (1994). L-arginine infusion promotes nitric oxide-dependent vasodilation, increases regional cerebral blood flow, and reduces infarction volume in the rat. *Stroke* **25**, 429-435.

NEWTON,K. and MANNING,G. (2016). Necroptosis and Inflammation. *Annu. Rev. Biochem.* **85**, 743-763.

NEYE,N., ENIGK,F., SHIVA,S., et al. (2012). Inhalation of NO during myocardial ischemia reduces infarct size and improves cardiac function. *Intensive Care Med.* **38**, 1381-1391.

NIEUWKAMP,D.J., SETZ,L.E., ALGRA,A., LINN,F.H., DE ROOIJ,N.K., and RINKEL,G.J. (2009). Changes in case fatality of aneurysmal subarachnoid haemorrhage over time, according to age, sex, and region: a meta-analysis. *Lancet Neurol.* **8**, 635-642.

NISHIDA,J., MCCUSKEY,R.S., MCDONNELL,D., and FOX,E.S. (1994). Protective role of NO in hepatic microcirculatory dysfunction during endotoxemia. *Am. J. Physiol* **267**, G1135-G1141.

NYHOLT,D.R., LEA,R.A., GOADSBY,P.J., BRIMAGE,P.J., and GRIFFITHS,L.R. (1998). Familial typical migraine: linkage to chromosome 19p13 and evidence for genetic heterogeneity. *Neurology* **50**, 1428-1432.

NYSTORIAK,M.A., O'CONNOR,K.P., SONKUSARE,S.K., BRAYDEN,J.E., NELSON,M.T., and WELLMAN,G.C. (2011). Fundamental increase in pressure-dependent constriction of brain parenchymal arterioles from subarachnoid hemorrhage model rats due to membrane depolarization. *Am. J. Physiol Heart Circ. Physiol* **300**, H803-H812.

OLIVER,J.A. (1992). Endothelium-derived relaxing factor contributes to the regulation of endothelial permeability. *J. Cell Physiol* **151**, 506-511.

OLSEN,T.S., LARSEN,B., HERNING,M., SKRIVER,E.B., and LASSEN,N.A. (1983). Blood flow and vascular reactivity in collaterally perfused brain tissue. Evidence of an ischemic penumbra in patients with acute stroke. *Stroke* **14**, 332-341.

OMMAYA,A.K., GRUBB,R.L., JR., and NAUMANN,R.A. (1971). Coup and contre-coup injury: observations on the mechanics of visible brain injuries in the rhesus monkey. *J. Neurosurg.* **35**, 503-516.

OSTROWSKI,R.P., COLOHAN,A.R., and ZHANG,J.H. (2006). Molecular mechanisms of early brain injury after subarachnoid hemorrhage. *Neurol. Res.* **28**, 399-414.

PALL,M.L. (2007). Nitric oxide synthase partial uncoupling as a key switching mechanism for the NO/ONOO-cycle. *Med Hypotheses* .

PARK,K.W., METAIS,C., DAI,H.B., COMUNALE,M.E., and SELLKE,F.W. (2001). Microvascular endothelial dysfunction and its mechanism in a rat model of subarachnoid hemorrhage. *Anesth. Analg.* **92**, 990-996.

PARMENTIER,S., BOHME,G.A., LEROUET,D., et al. (1999). Selective inhibition of inducible nitric oxide synthase prevents ischaemic brain injury. *Br. J. Pharmacol.* **127**, 546-552.

PASPARAKIS,M. and VANDENABEELE,P. (2015). Necroptosis and its role in inflammation. *Nature* **517**, 311-320.

PEARLMUTTER,A.F., SZKRYBALO,M., KIM,Y., and HARIK,S.I. (1988). Arginine vasopressin receptors in pig cerebral microvessels, cerebral cortex and hippocampus. *Neurosci. Lett.* **87**, 121-126.

PENNINGS,F.A., ALBRECHT,K.W., MUIZELAAR,J.P., SCHUURMAN,P.R., and BOUMA,G.J. (2009). Abnormal responses of the human cerebral microcirculation to papaverin during aneurysm surgery. *Stroke* **40**, 317-320.

PENNINGS,F.A., BOUMA,G.J., and INCE,C. (2004). Direct observation of the human cerebral microcirculation during aneurysm surgery reveals increased arteriolar contractility. *Stroke* **35**, 1284-1288.

PEPKE-ZABA,J., HIGENBOTTAM,T.W., DINH-XUAN,A.T., STONE,D., and WALLWORK,J. (1991). Inhaled nitric oxide as a cause of selective pulmonary vasodilatation in pulmonary hypertension. *Lancet* **338**, 1173-1174.

PERREIN,A., PETRY,L., REIS,A., BAUMANN,A., MERTES,P., and AUDIBERT,G. (2015). Cerebral vasospasm after traumatic brain injury: an update. *Minerva Anesthesiol.* **81**, 1219-1228.

PETROV,T., PAGE,A.B., OWEN,C.R., and RAFOLS,J.A. (2000). Expression of the inducible nitric oxide synthase in distinct cellular types after traumatic brain injury: an in situ hybridization and immunocytochemical study. *Acta Neuropathol. (Berl)* **100**, 196-204.

PISAPIA,J.M., XU,X., KELLY,J., et al. (2012). Microthrombosis after experimental subarachnoid hemorrhage: time course and effect of red blood cell-bound thrombin-activated pro-urokinase and clazosentan. *Exp. Neurol.* **233**, 357-363.

PLESNILA,N. (2016). The immune system in traumatic brain injury. *Curr. Opin. Pharmacol.* **26**, 110-117.

PLUTA,R.M. (2006). Dysfunction of nitric oxide synthases as a cause and therapeutic target in delayed cerebral vasospasm after SAH. *Neurol. Res.* **28**, 730-737.

PLUTA,R.M., DEJAM,A., GRIMES,G., GLADWIN,M.T., and OLDFIELD,E.H. (2005). Nitrite infusions to prevent delayed cerebral vasospasm in a primate model of subarachnoid hemorrhage. *JAMA* **293**, 1477-1484.

POVLISHOCK,J.T. (1986). Traumatically induced axonal damage without concomitant change in focally related neuronal somata and dendrites. *Acta Neuropathol. (Berl)* **70**, 53-59.

PUN,P.B., LU,J., and MOOCHHALA,S. (2009). Involvement of ROS in BBB dysfunction. *Free Radic. Res.* **43**, 348-364.

RAGGENBASS,M. (2008). Overview of cellular electrophysiological actions of vasopressin. *Eur. J. Pharmacol.* **583**, 243-254.

RATSEP,M.T., BARRETTE,V.F., WINTERBORN,A., ADAMS,M.A., and CROY,B.A. (2013). Hemodynamic and behavioral differences after administration of meloxicam, buprenorphine, or tramadol as analgesics for telemeter implantation in mice. *J. Am. Assoc. Lab Anim Sci.* **52**, 560-566.

REILLY,P.L., GRAHAM,D.I., ADAMS,J.H., and JENNETT,B. (1975). Patients with head injury who talk and die. *Lancet* **2**, 375-377.

RIBAS,G.C. and JANE,J.A. (1992). Traumatic contusions and intracerebral hematomas. *J. Neurotrauma* **9 Suppl 1**, S265-S278.

RIMAR,S. and GILLIS,C.N. (1993). Selective pulmonary vasodilation by inhaled nitric oxide is due to hemoglobin inactivation. *Circulation* **88**, 2884-2887.

RIVERO-ARIAS,O., GRAY,A., and WOLSTENHOLME,J. (2010). Burden of disease and costs of aneurysmal subarachnoid haemorrhage (aSAH) in the United Kingdom. *Cost. Eff. Resour. Alloc.* **8**, 6.

SABRI,M., AI,J., LAKOVIC,K., D'ABBONDANZA,J., ILODIGWE,D., and MACDONALD,R.L. (2012). Mechanisms of microthrombi formation after experimental subarachnoid hemorrhage. *Neuroscience* **224**, 26-37.

SABRI,M., LASS,E., and MACDONALD,R.L. (2013). Early brain injury: a common mechanism in subarachnoid hemorrhage and global cerebral ischemia. *Stroke Res. Treat.* **2013**, 394036.

SAITO,N., CHANG,C., KAWAI,K., et al. (1990). Role of neuroexcitation in development of blood-brain barrier and oedematous changes following cerebral ischaemia and traumatic brain injury. *Acta Neurochir. Suppl (Wien.)* **51**, 186-188.

SALOM,J.B., TORREGROSA,G., and ALBORCH,E. (1995). Endothelins and the cerebral circulation. *Cerebrovasc. Brain Metab Rev.* **7**, 131-152.

SANDVEI,M.S., MATHIESEN,E.B., VATTEN,L.J., et al. (2011). Incidence and mortality of aneurysmal subarachnoid hemorrhage in two Norwegian cohorts, 1984-2007. *Neurology* **77**, 1833-1839.

SANTIZO,R., BAUGHMAN,V.L., and PELLIGRINO,D.A. (2000). Relative contributions from neuronal and endothelial nitric oxide synthases to regional cerebral blood flow changes during forebrain ischemia in rats. *Neuroreport* **11**, 1549-1553.

SAYAMA,T., SUZUKI,S., and FUKUI,M. (1998). Expression of inducible nitric oxide synthase in rats following subarachnoid hemorrhage. *Neurol. Res.* **20**, 79-84.

SAYAMA,T., SUZUKI,S., and FUKUI,M. (1999). Role of inducible nitric oxide synthase in the cerebral vasospasm after subarachnoid hemorrhage in rats. *Neurol. Res.* **21**, 293-298.

SCHILLING,L., FEGER,G.I., EHRENREICH,H., and WAHL,M. (1995). Endothelin-3-induced relaxation of isolated rat basilar artery is mediated by an endothelial ETB-type endothelin receptor. *J. Cereb. Blood Flow Metab* **15**, 699-705.

SCHUBERT,G.A., SEIZ,M., HEGEWALD,A.A., MANVILLE,J., and THOME,C. (2009). Acute hypoperfusion immediately after subarachnoid hemorrhage: a xenon contrast-enhanced CT study. *J. Neurotrauma* **26**, 2225-2231.

SCHUBERT,G.A., SEIZ,M., HEGEWALD,A.A., MANVILLE,J., and THOME,C. (2011). Hypoperfusion in the acute phase of subarachnoid hemorrhage. *Acta Neurochir. Suppl* **110**, 35-38.

SCHULZ,J., PLESNILA,N., ERISKAT,J., STOFFEL,M., PRUNEAU,D., and BAETHMANN,A. (2000). LF16-0687 a novel non-peptide bradykinin B2 receptor antagonist reduces vasogenic brain edema from a focal lesion in rats. *Acta Neurochir. Suppl* **76**, 137-139.

SCHWARTZ,A.Y., SEHBA,F.A., and BEDERSON,J.B. (2000). Decreased nitric oxide availability contributes to acute cerebral ischemia after subarachnoid hemorrhage. *Neurosurgery* **47**, 208-214.

SCHWARZMAIER,S.M., GALLOZZI,M., and PLESNILA,N. (2015a). Identification of the Vascular Source of Vasogenic Brain Edema following Traumatic Brain Injury Using In Vivo 2-Photon Microscopy in Mice. *J. Neurotrauma* **32**, 990-1000.

SCHWARZMAIER,S.M., KIM,S.W., TRABOLD,R., and PLESNILA,N. (2010). Temporal profile of thrombogenesis in the cerebral microcirculation after traumatic brain injury in mice. *J Neurotrauma* **27**, 121-130.

SCHWARZMAIER,S.M., TERPOLILLI,N.A., DIENEL,A., et al. (2015b). Endothelial nitric oxide synthase mediates arteriolar vasodilatation after traumatic brain injury in mice. *J. Neurotrauma* **32**, 731-738.

SEHARA,Y., HAYASHI,T., DEGUCHI,K., et al. (2006). Distribution of inducible nitric oxide synthase and cell proliferation in rat brain after transient middle cerebral artery occlusion. *Brain Res.* **1093**, 190-197.

SEHBA,F.A. and BEDERSON,J.B. (2011a). Nitric oxide in early brain injury after subarachnoid hemorrhage. *Acta Neurochir. Suppl* **110**, 99-103.

SEHBA,F.A., CHERESHNEV,I., MAAYANI,S., FRIEDRICH,V., JR., and BEDERSON,J.B. (2004). Nitric oxide synthase in acute alteration of nitric oxide levels after subarachnoid hemorrhage. *Neurosurgery* **55**, 671-677.

SEHBA,F.A., DING,W.H., CHERESHNEV,I., and BEDERSON,J.B. (1999). Effects of S-nitrosoglutathione on acute vasoconstriction and glutamate release after subarachnoid hemorrhage. *Stroke* **30**, 1955-1961.

SEHBA,F.A. and FRIEDRICH,V. (2011b). Early micro vascular changes after subarachnoid hemorrhage. *Acta Neurochir. Suppl* **110**, 49-55.

SEHBA,F.A., FRIEDRICH,V., JR., MAKONNEN,G., and BEDERSON,J.B. (2007). Acute cerebral vascular injury after subarachnoid hemorrhage and its prevention by administration of a nitric oxide donor. *J. Neurosurg.* **106**, 321-329.

SEHBA,F.A., HOU,J., PLUTA,R.M., and ZHANG,J.H. (2012). The importance of early brain injury after subarachnoid hemorrhage. *Prog. Neurobiol.* **97**, 14-37.

SEHBA,F.A., MOSTAFA,G., FRIEDRICH,V., JR., and BEDERSON,J.B. (2005). Acute microvascular platelet aggregation after subarachnoid hemorrhage. *J. Neurosurg.* **102**, 1094-1100.

SEHBA,F.A., SCHWARTZ,A.Y., CHERESHNEV,I., and BEDERSON,J.B. (2000). Acute decrease in cerebral nitric oxide levels after subarachnoid hemorrhage. *J Cereb Blood Flow Metab* **20**, 604-611.

SHIBATA,M., ARAKI,N., HAMADA,J., SASAKI,T., SHIMAZU,K., and FUKUUCHI,Y. (1996). Brain nitrite production during global ischemia and reperfusion: an in vivo microdialysis study. *Brain Res.* **734**, 86-90.

SHIGEMORI,Y., KATAYAMA,Y., MORI,T., MAEDA,T., and KAWAMATA,T. (2006). Matrix metalloproteinase-9 is associated with blood-brain barrier opening and brain edema formation after cortical contusion in rats. *Acta Neurochir. Suppl* **96**, 130-133.

SIESJO,B.K. (1992a). Pathophysiology and treatment of focal cerebral ischemia. Part I: Pathophysiology. *J. Neurosurg.* **77**, 169-184.

SIESJO,B.K. (1992b). Pathophysiology and treatment of focal cerebral ischemia. Part II: Mechanisms of damage and treatment. *J. Neurosurg.* **77**, 337-354.

SINZ,E.H., KOCHANEK,P.M., DIXON,C.E., et al. (1999). Inducible nitric oxide synthase is an endogenous neuroprotectant after traumatic brain injury in rats and mice. *J. Clin. Invest* **104**, 647-656.

SOFRONIEW,M.V. (1983). Morphology of vasopressin and oxytocin neurones and their central and vascular projections. *Prog. Brain Res.* **60**, 101-114.

SRIDHARAN,S.E., UNNIKISHNAN,J.P., SUKUMARAN,S., et al. (2009). Incidence, types, risk factors, and outcome of stroke in a developing country: the Trivandrum Stroke Registry. *Stroke* **40**, 1212-1218.

STAM,A.H., LUIJCKX,G.J., POLL-THE BT, et al. (2009). Early seizures and cerebral edema after trivial head trauma associated with the CACNA1A S218L mutation. *J Neurol. Neurosurg. Psychiatry* .

STAM,A.H., VAN DEN MAAGDENBERG,A.M., HAAN,J., TERWINDT,G.M., and FERRARI,M.D. (2008). Genetics of migraine: an update with special attention to genetic comorbidity. *Curr. Opin. Neurol.* **21**, 288-293.

STOFFEL,M., RINECKER,M., PLESNILA,N., ERISKAT,J., and BAETHMANN,A. (2000). Attenuation of secondary lesion growth in the brain after trauma by selective inhibition of the inducible NO-synthase. *Acta Neurochir. Suppl* **76**, 357-358.

STOVER,J.F., BELLI,A., BORET,H., et al. (2014). Nitric oxide synthase inhibition with the antipterin VAS203 improves outcome in moderate and severe traumatic brain injury: a placebo-controlled randomized Phase IIa trial (NOSTRA). *J. Neurotrauma* **31**, 1599-1606.

STRONG,A.J., FABRICIUS,M., BOUTELLE,M.G., et al. (2002). Spreading and synchronous depressions of cortical activity in acutely injured human brain. *Stroke* **33**, 2738-2743.

SUN,B.L., ZHANG,S.M., XIA,Z.L., et al. (2003). L-arginine improves cerebral blood perfusion and vasomotion of microvessels following subarachnoid hemorrhage in rats. *Clin. Hemorheol. Microcirc.* **29**, 391-400.

SUN,B.L., ZHENG,C.B., YANG,M.F., YUAN,H., ZHANG,S.M., and WANG,L.X. (2009). Dynamic alterations of cerebral pial microcirculation during experimental subarachnoid hemorrhage. *Cell Mol. Neurobiol.* **29**, 235-241.

SUZUKI,M., TABUCHI,M., IKEDA,M., and TOMITA,T. (2002). Concurrent formation of peroxynitrite with the expression of inducible nitric oxide synthase in the brain during middle cerebral artery occlusion and reperfusion in rats. *Brain Res.* **951**, 113-120.

SYMON,L. (1969). The concept of intracerebral steal. *Int. Anesthesiol. Clin.* **7**, 597-615.

SZMYDYNGER-CHODOBSKA,J., CHUNG,I., KOZNIEWSKA,E., et al. (2004). Increased expression of vasopressin v1a receptors after traumatic brain injury. *J. Neurotrauma* **21**, 1090-1102.

TAKANO,T., TIAN,G.F., PENG,W., et al. (2007). Cortical spreading depression causes and coincides with tissue hypoxia. *Nat. Neurosci.* **10**, 754-762.

TERPOLILLI,N.A., BREM,C., BUHLER,D., and PLESNILA,N. (2015). Are We Barking Up the Wrong Vessels? Cerebral Microcirculation After Subarachnoid Hemorrhage. *Stroke* .

TERPOLILLI,N.A., FEILER,S., DIENEL,A., et al. (2016). Nitric oxide inhalation reduces brain damage, prevents mortality, and improves neurological outcome after subarachnoid hemorrhage by resolving early pial microvasospasms. *J. Cereb. Blood Flow Metab* **36**, 2096-2107.

TERPOLILLI,N.A., MOSKOWITZ,M.A., and PLESNILA,N. (2012). Nitric oxide: considerations for the treatment of ischemic stroke. *J Cereb. Blood Flow Metab* **32**, 1332-1346.

TERWINDT,G.M., OPHOFF,R.A., VAN EIJK,R., et al. (2001). Involvement of the CACNA1A gene containing region on 19p13 in migraine with and without aura. *Neurology* **56**, 1028-1032.

THADANI,U. and RODGERS,T. (2006). Side effects of using nitrates to treat angina. *Expert. Opin. Drug Saf* **5**, 667-674.

THAL,S.C. and PLESNILA,N. (2007). Non-invasive intraoperative monitoring of blood pressure and arterial pCO<sub>2</sub> during surgical anesthesia in mice. *J. Neurosci. Methods* **159**, 261-267.

THOMALE,U.W., KROPENSTEDT,S.N., BEYER,T.F., SCHASER,K.D., UNTERBERG,A.W., and STOVER,J.F. (2002). Temporal profile of cortical perfusion and microcirculation after controlled cortical impact injury in rats. *J. Neurotrauma* **19**, 403-413.

TODA,N., AYAJIKI,K., and OKAMURA,T. (2009). Cerebral blood flow regulation by nitric oxide: recent advances. *Pharmacol. Rev.* **61**, 62-97.

TRABOLD,R., EROS,C., ZWECKBERGER,K., et al. (2010). The role of bradykinin B(1) and B(2) receptors for secondary brain damage after traumatic brain injury in mice. *J. Cereb. Blood Flow Metab* **30**, 130-139.

TRABOLD,R., KRIEG,S., SCHOLLER,K., and PLESNILA,N. (2008). Role of vasopressin V(1a) and V2 receptors for the development of secondary brain damage after traumatic brain injury in mice. *J. Neurotrauma* **25**, 1459-1465.

TRABOLD,R., SCHUELER,O.G., ERISKAT,J., PLESNILA,N., BAETHMANN,A.J., and BACK,T. (2006). Arterial hypotension triggers perifocal depolarizations and aggravates secondary damage in focal brain injury. *Brain Res.* **1071**, 237-244.

TSO,M.K. and MACDONALD,R.L. (2013). Acute microvascular changes after subarachnoid hemorrhage and transient global cerebral ischemia. *Stroke Res. Treat.* **2013**, 425281.

TUBBS,J.T., KISSLING,G.E., TRAVLOS,G.S., et al. (2011). Effects of buprenorphine, meloxicam, and flunixin meglumine as postoperative analgesia in mice. *J. Am. Assoc. Lab Anim Sci.* **50**, 185-191.

UHL,E., LEHMBERG,J., STEIGER,H.J., and MESSMER,K. (2003). Intraoperative detection of early microvasospasm in patients with subarachnoid hemorrhage by using orthogonal polarization spectral imaging. *Neurosurgery* **52**, 1307-1315.

UNTERBERG,A.W., STOVER,J., KRESS,B., and KIENING,K.L. (2004). Edema and brain trauma. *Neuroscience* **129**, 1021-1029.

VAKILI,A., KATAOKA,H., and PLESNILA,N. (2005). Role of arginine vasopressin V1 and V2 receptors for brain damage after transient focal cerebral ischemia. *J. Cereb. Blood Flow Metab* **25**, 1012-1019.

VAN ASCH,C.J., LUITSE,M.J., RINKEL,G.J., VAN,D.T., I, ALGRA,A., and KLIJN,C.J. (2010). Incidence, case fatality, and functional outcome of intracerebral haemorrhage over time, according to age, sex, and ethnic origin: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Neurol.* **9**, 167-176.

VAN DER KOLK,N.M., ALGRA,A., and RINKEL,G.J. (2010). Risk of aneurysm rupture at intracranial arterial bifurcations. *Cerebrovasc. Dis.* **30**, 29-35.

VAN GIJN,J. and RINKEL,G.J. (2001). Subarachnoid haemorrhage: diagnosis, causes and management. *Brain* **124**, 249-278.

VAN,D., V, SMITH,D., O'NEILL,C.A., et al. (1994). Interactions of peroxynitrite with human plasma and its constituents: oxidative damage and antioxidant depletion. *Biochem. J.* **303 ( Pt 1)**, 295-301.

VANLANGENAKKER,N., VANDEN BERGHE,T., BOGAERT,P., et al. (2011). cIAP1 and TAK1 protect cells from TNF-induced necrosis by preventing RIP1/RIP3-dependent reactive oxygen species production. *Cell Death. Differ.* **18**, 656-665.

VATTER,H., WEIDAUER,S., DIAS,S., et al. (2007). Persistence of the nitric oxide-dependent vasodilator pathway of cerebral vessels after experimental subarachnoid hemorrhage. *Neurosurgery* **60**, 179-187.

VATTER,H., ZIMMERMANN,M., TESANOVIC,V., RAABE,A., SCHILLING,L., and SEIFERT,V. (2005a). Cerebrovascular characterization of clazosentan, the first nonpeptide endothelin receptor antagonist clinically effective for the treatment of cerebral vasospasm. Part I: inhibitory effect on endothelin(A) receptor-mediated contraction. *J. Neurosurg.* **102**, 1101-1107.

VATTER,H., ZIMMERMANN,M., TESANOVIC,V., RAABE,A., SEIFERT,V., and SCHILLING,L. (2005b). Cerebrovascular characterization of clazosentan, the first nonpeptide endothelin receptor antagonist shown to be clinically effective for the treatment of cerebral vasospasm. Part II: effect on endothelin(B) receptor-mediated relaxation. *J. Neurosurg.* **102**, 1108-1114.

WADA,K., CHATZIPANTELI,K., BUSTO,R., and DIETRICH,W.D. (1998). Role of nitric oxide in traumatic brain injury in the rat. *J. Neurosurg.* **89**, 807-818.

WADA,K., CHATZIPANTELI,K., BUSTO,R., and DIETRICH,W.D. (1999). Effects of L-NAME and 7-NI on NOS catalytic activity and behavioral outcome after traumatic brain injury in the rat. *J. Neurotrauma* **16**, 203-212.

WANG,Y.Q., WANG,L., ZHANG,M.Y., et al. (2012). Necrostatin-1 suppresses autophagy and apoptosis in mice traumatic brain injury model. *Neurochem. Res.* **37**, 1849-1858.

WEI,E.P., DIETRICH,W.D., POVLISHOCK,J.T., NAVARI,R.M., and KONTOS,H.A. (1980). Functional, morphological, and metabolic abnormalities of the cerebral microcirculation after concussive brain injury in cats. *Circ. Res.* **46**, 37-47.

WEIR,B., GRACE,M., HANSEN,J., and ROTHBERG,C. (1978). Time course of vasospasm in man. *J. Neurosurg.* **48**, 173-178.

WELLMAN,G.C. and KOIDE,M. (2013). Impact of subarachnoid hemorrhage on parenchymal arteriolar function. *Acta Neurochir. Suppl* **115**, 173-177.

WHO. Projections of mortality and causes of death, 2015 and 2030. [http://www.who.int/healthinfo/global\\_burden\\_disease/projections/en/](http://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/projections/en/) . 12-2-2016.

YANG,M.F., SUN,B.L., XIA,Z.L., ZHU,L.Z., QIU,P.M., and ZHANG,S.M. (2003). Alleviation of brain edema by L-arginine following experimental subarachnoid hemorrhage in a rat model. *Clin. Hemorheol. Microcirc.* **29**, 437-443.

YOU,Z., SAVITZ,S.I., YANG,J., et al. (2008). Necrostatin-1 reduces histopathology and improves functional outcome after controlled cortical impact in mice. *J. Cereb. Blood Flow Metab* **28**, 1564-1573.

YULUG,B., CAM,E., YILDIZ,A., and KILIC,E. (2007). Buprenorphine does not aggravate ischemic neuronal injury in experimental focal cerebral ischemia. *J. Neuropsychiatry Clin. Neurosci.* **19**, 331-334.

ZHANG,H., ADWANIKAR,H., WERB,Z., and NOBLE-HAEUSSLEIN,L.J. (2010). Matrix metalloproteinases and neurotrauma: evolving roles in injury and reparative processes. *Neuroscientist.* **16**, 156-170.

ZHENG,V.Z. and WONG,G.K.C. (2017). Neuroinflammation responses after subarachnoid hemorrhage: A review. *J. Clin. Neurosci.* **42**, 7-11.

ZHOU,W., XU,D., PENG,X., ZHANG,Q., JIA,J., and CRUTCHER,K.A. (2008). Meta-analysis of APOE4 allele and outcome after traumatic brain injury. *J Neurotrauma* **25**, 279-290.

ZWECKBERGER,K., EROS,C., ZIMMERMANN,R., KIM,S.W., ENGEL,D., and PLESNILA,N. (2006). Effect of early and delayed decompressive craniectomy on secondary brain damage after controlled cortical impact in mice. *J. Neurotrauma.* **23**, 1083-1093.

ZWECKBERGER,K. and PLESNILA,N. (2009). Anatibant, a selective non-peptide bradykinin B2 receptor antagonist, reduces intracranial hypertension and histopathological damage after experimental traumatic brain injury. *Neurosci. Lett.* **454**, 115-117.

## 7. Links zu den Originalarbeiten

### 7.1 Manuskript 1

Nicole A. Terpolilli, Seong-Woong Kim, Serge C. Thal, Hiroharu Kataoka, Vilia Zeisig, Bjoern Nitzsche, Benjamin Klaesner, Changlian Zhu, Susanne Schwarzmaier, Lilja Meissner, Uta Mamrak, Doortje Engel, Alexander Drzezha, Rakesh P. Patel, Klas Blomgren, Henryk Barthel, Johannes Boltze, Wolfgang M. Kuebler, Nikolaus Plesnila

Inhalation of Nitric oxide prevents Ischemic Brain Damage in Experimental Stroke by Selective Dilatation of Collateral Arterioles

Circulation Research, 2012 Mar 2;110(5):727-38.

DOI: [10.1161/CIRCRESAHA.111.253419](https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.111.253419)

### 7.2 Manuskript 2

Doortje Engel, Günther Mies, Nicole A. Terpolilli, Raimund Trabold, Alexander Loch, Chris I De Zeeuw, John T. Weber, Andrew I. R. Maas, Nikolaus Plesnila

CHanges of Cerebral Blood Flow during the Secondary Expansion of a Cortical Contusion Assesses by C<sup>14</sup>-Iodoantipyrine Autoradiography in Muce Using a Non-Invasive Protocol

Journal of Neurotrauma 2008, 25;739-753

DOI: [10.1089/neu.2008.0853](https://doi.org/10.1089/neu.2008.0853)

### 7.3 Manuskript 3

Nicole A. Terpolilli, Seong-Woong Kim, Serge Thal, Wolfgang M. Kübler, Nikolaus Plesnila

Inhaled nitric oxide reduces secondary brain damage after traumatic brain injury in mice.

Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism. 2013, 33(2):311-8. |

DOI: [10.1038/jcbfm.2012.176](https://doi.org/10.1038/jcbfm.2012.176)

### 7.4 Manuskript 4

Nicole A. Terpolilli, Segej Feiler, Ari Dienel, Frank Müller, Nicole Heumos, Benjamin Friedrich, John Stover, Karsten Schöller, Nikolaus Plesnila

Nitric oxide inhalation reduces brain damage, prevents mortality, and improves neurological outcome after subarachnoid hemorrhage by resolving early pial microvasospasms.

Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism 2016, 36(12):2096-2107

DOI: [10.1177/0271678X15605848](https://doi.org/10.1177/0271678X15605848)

### 7.5 Manuskript 5

Nicole A. Terpolilli, Klaus Zweckberger, Raimund Trabold, Lothar Schilling, Reinhard Schinzel, Frank Tegtmeier, Nikolaus Plesnila

The novel nitric oxide synthase inhibitor 4-amino-tetrahydro-L-biopterine prevents brain edema formation and intracranial hypertension following traumatic brain injury in mice.

Journal of Neurotrauma. 2009, 26(11):1963-75

DOI: [10.1089/neu.2008.0853](https://doi.org/10.1089/neu.2008.0853)

### 7.6 Manuskript 6

Susanne M. Schwarzmaier SM, Nicole A. **Terpolilli**, Ari Diemel, Micaela Gallozzi, Reinhard Schinzel, Frank Tegtmeier, Nikolaus Plesnila N.

Endothelial nitric oxide synthase mediates arteriolar vasodilatation after traumatic brain injury in mice.

Journal of Neurotrauma. 2015, 15;32(10):731-8

DOI: [10.1089/neu.2014.3650](https://doi.org/10.1089/neu.2014.3650)

### 7.7 Manuskript 7

Arn M. J. M. van den Maagdenberg\*, Tommaso Pizzorusso\*, Simon Kaja\*, Nicole A. Terpolilli\*, Maria Shapovalova, Hoebeek FE, Curtis F. Barrett, Laura Gherardini, van de Ven RCG, Todorov B, Broos LAM, Angelica Tottene, Gao Z, Fodor M, Chris I. De Zeeuw, Rune R. Frants, Nikolaus Plesnila, Plomp JJ, Daniela Pietrobon, Michel D. Ferrari

High CSD susceptibility and migraine-associated symptoms in CaV2.1 S218L mice.

Annals of Neurology 2010 ,67(1):85-98. (\*equally contributing author)

DOI: [10.1002/ana.21815](https://doi.org/10.1002/ana.21815)

### 7.8 Manuskript 8

Katrin Rauen, Raimund Trabold, Christian Brem, Nicole A. Terpolilli, Nikolaus Plesnila.

Arginine Vasopressive V1a Receptor Deficient Mice Have Reduced Brain Edema and Secondary Brain Damage Following Traumatic Brain Injury

Journal of Neurotrauma 2013, 30;1442-1448

DOI: [10.1089/neu.2012.2807](https://doi.org/10.1089/neu.2012.2807)

### 7.9 Manuskript 9

Goutham C. Ganjam, Nicole A. Terpolilli, Sebastian Diemert, Ina Eisenbach, Lena Hoffmann, Christina Reuther, Christiane Herden, Joachim Roth, Nikolaus Plesnila, Carsten Culmsee

Cylindromatosis mediates neuronal cell death in vitro and in vivo

Cell Death and Differentiation, 2018, 25(8):1394-1407

DOI: [10.1038/s41418-017-0046-7](https://doi.org/10.1038/s41418-017-0046-7)

## 7.10 Manuskript 10

Hanhan Liu, Ari Dienel, Karsten Schöller, Susanne Schwarzmaier, Kathrin Nehr Korn, Nikolaus Plesnila, Nicole A. Terpolilli

Microvasospasms after experimental subarachnoid hemorrhage do not depend on endothelin A receptors.

Stroke. 2018, 49(3):693-699

DOI: [10.1161/STROKEAHA.117.020028](https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.117.020028)

## 8. Danksagung

Folgenden Personen, die entscheidend zum Gelingen des Habilitationsprojekts beigetragen haben, möchte ich danken:

Meiner ganzen Familie, insbesondere meinem Mann Tim Kolbet, meinen Eltern und meinem Bruder Stephan, die mich während der gesamten Forschungsvorhaben immer und in allen erdenklichen Weisen unterstützt haben.

Herrn Prof. Dr. Nikolaus Plesnila, der mich seit dem Beginn der Promotionsarbeit vor nun über 13 Jahren immer gefördert, in allen Aspekten der wissenschaftlichen Arbeit ausgebildet und mich somit in meiner Forschungstätigkeit entscheidend geprägt hat. Ohne seine Unterstützung in intellektueller und auch praktischer Hinsicht (seit mehreren Jahren als Gastwissenschaftler in seiner Arbeitsgruppe) wäre das Habilitationsprojekt nicht in dieser Form möglich gewesen.

Herrn Prof. Dr. Jörg-Christian Tonn, der seit meinem Eintritt in die Klinik alle Forschungstätigkeiten immer unterstützt hat, mir die Durchführung von Projekten neben der klinischen Ausbildung ermöglicht hat und so die Voraussetzung für diese Habilitationsarbeit geschaffen hat.

Meinen Kollegen PD Dr. Karsten Schöller und Dr. Raimund Trabold für die langjährige Zusammenarbeit in der Arbeitsgruppe sowie die gemeinsamen erfolgreichen Bemühungen, die Projekte trotz des Klinik-Alltags am Laufen zu halten.

Frau Dr. Susanne Schwarzmaier, für die seit langem gut funktionierende Kollaboration sowie die Unterstützung in allen wissenschaftlichen Lebenslagen.

Herrn Dr. Seoong-Wong Kim und Herrn Dr. Sergej Feiler, meinen langjährigen und unermüdlichen Mitstreitern in allen NO-Inhalationsprojekten von Beginn meines Promotionsprojekts an.

Herrn PD Dr. Klaus Zweckberger und Herrn PD Dr. Serge Thal, die mir in meiner Anfangszeit als Doktorandin im Institut für Chirurgische Forschung viel geholfen haben und beratend zur Seite standen.

Herrn Prof. Dr. Alexander Baethmann für die Aufnahme als Doktorandin an das Institut für Chirurgische Forschung und in die Arbeitsgruppe sowie für die Möglichkeit, die internationale Seite der neurochirurgischen Forschung sowie den Stellenwert des mingling kennen zu lernen.

Herrn Prof. Dr. Stefan Zausinger, für die jahrelange wohlwollende Unterstützung meines Habilitationsprojekts und meiner klinischen Tätigkeit mit Rat und Tat.

Frau Dr. Farida Hellal, Frau Dr. Kathrin Nehr Korn und Frau Dr. Burcu Seker, für ihre Hilfe bei allen experimentellen Fragen und ihre große Hilfsbereitschaft.

Frau Uta Mamrak, ohne deren technische, operative und organisatorische Expertise vieles schwierig oder nicht möglich gewesen wäre.

Allen Doktoranden, die ich bisher mitbetreuen durfte und die einen wichtigen Teil zum Gelingen des Habilitationsprojekts beigetragen haben, außerdem Frau Dr. Katrin Rauen und Herrn Frank Müller.

Herrn Prof. Carsten Culmsee und Frau Prof. Amalia Dolga für die langjährige und sehr erfolgreiche Kollaboration.

Herrn Prof. Ulrich Pohl, Leiter des Walter-Brendel-Zentrums, sowie Herrn Prof. Martin Dichgans, Leiter des Instituts für Schlaganfall- und Demenzforschung, für die freundliche und wohlwollende Aufnahme an ihren jeweiligen Instituten sowie die Möglichkeit zur Nutzung der Ressourcen der Einrichtungen.

Herrn Dr. Jürgen Peters für seine Expertise in statistischen Belangen und den häufigen Beistand bei allen Arten von software- und hardware-bedingten Notlagen.

Herrn Dieter Müller, dessen organisatorisches Talent und beherztes Eingreifen am ICF manchen Versuch vor Verzögerung oder Scheitern bewahrt haben.

Frau PD Dr. Louisa von Baumgarten und Herrn PD Dr. Sebastian Pratschke, meinen ehemaligen Mit-Doktoranden am ICF, sowie Frau PD Dr. Sabine Weiß und Frau Bettina Koch, für die langjährige freundschaftliche Unterstützung.