

Aus dem Institut für Chirurgische Forschung  
der  
Ludwig – Maximilians – Universität München  
Kommissarischer Leiter: Prof. Dr. U. Pohl

**Einfluss der Stickstoff – Monoxid – Inhalation  
auf den sekundären Hirnschaden nach  
experimentellem Schädelhirntrauma**

Dissertation  
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig – Maximilians – Universität zu München

vorgelegt von  
Nicole Angela Terpolilli  
aus München  
2008

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

1. Berichterstatter: Prof. Dr. N. Plesnila

2. Berichterstatter: Prof. Dr. H.-W. Pfister

Mitberichterstatter: Prof. Dr. M. Thiel

Prof. Dr. J. Herms

Dekan: Prof. Dr. med. D. Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 03.04.2008

Für Oma und Nonna



<b>1</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>9</b>
1.1	Das Schädelhirntrauma.....	9
1.1.1	Epidemiologie und Ätiologie.....	9
1.1.2	Einteilung.....	9
1.1.3	Pathophysiologie.....	11
1.1.3.1	Primärschaden.....	11
1.1.3.2	Sekundärer Hirnschaden.....	12
1.1.3.3	Bedeutung einzelner Parameter für die Prognose nach SHT.....	15
1.2	Stickstoffmonoxid (NO) und seine Anwendung.....	15
1.2.1	Allgemeines.....	15
1.2.2	Die Rolle von NO im Gehirn.....	17
1.2.2.1	Physiologische Aufgaben von NO im ZNS.....	17
1.2.2.2	Die Rolle von NO bei zerebralen Insulten.....	17
1.2.3	NO als therapeutisches Zielmolekül.....	18
1.2.3.1	NO - Inhalation.....	19
1.2.3.2	Extrapulmonale Wirkungen der NO - Inhalation.....	20
1.2.3.3	Mögliche Wirkmechanismen inhalierten Stickstoffmonoxids.....	21
1.2.3.4	NO - Inhalation und Gehirn.....	23
1.2.3.5	NO - Inhalation als selektiver Vasodilatator in hypoxischen Hirnarealen.....	30
1.3	Ziel der vorliegenden Studie.....	33
<b>2</b>	<b>Material und Methoden.....</b>	<b>35</b>

2.1	Versuchstiere.....	35
2.2	Narkose.....	35
2.3	Chirurgische Präparation und Überwachung.....	35
2.3.1	Mechanische Ventilation.....	35
2.3.2	Messung des systolischen Blutdrucks.....	36
2.3.3	Messung des intrakraniellen Drucks.....	37
2.3.4	Messung der zerebralen Durchblutung.....	37
2.3.5	Trauma - Induktion.....	38
2.3.6	NO - Inhalation.....	40
2.3.7	Experimentelle Gruppen.....	41
2.3.8	Körpergewicht.....	42
2.3.9	Histologische Auswertung des Nekrosevolumens.....	43
2.3.9.1	Herstellung der Präparate.....	43
2.3.9.2	Auswertung durch Histomorphometrie.....	43
2.3.10	Bestimmung des Hirn - Wassergehalts.....	44
2.3.11	Bestimmung von Eisen - Nitrosyl - Hämoglobin.....	44
2.3.12	Bestimmung der Blutungszeit.....	45
2.3.13	Messung von Nitrit und Nitrat im Plasma.....	45
2.3.14	Bestimmung von S - Nitroso - Hämoglobin.....	48
2.3.15	Protein - Nitrosylierung.....	49
2.3.16	Bestimmung der NO – Synthasen - Expression.....	49
2.3.17	Statistische Analyse.....	51
<b>3</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>52</b>

3.1	90 - minütige NO - Inhalation.....	52
3.1.1	Vitalparameter.....	52
3.1.2	Mittlerer arterieller Blutdruck.....	53
3.1.3	Intrakranieller Druck.....	53
3.1.4	Zerebrale Durchblutung nach Trauma.....	54
3.2	Nekrosevolumina nach längerfristiger Beatmung mit 50 ppm NO.....	57
3.2.1	24h iNO.....	57
3.2.2	Verzögerter Beginn der längerfristigen NO - Beatmung.....	58
3.2.3	NO - Inhalation in den ersten 12 bzw. 18 Stunden nach Trauma.....	59
3.2.4	Intermittierende NO - Inhalation.....	60
3.3	Ausbildung des posttraumatischen Hirnödems unter iNO.....	61
3.4	Nitrosyl - Hämoglobin - Bestimmung.....	62
3.5	Nitrit - Nitrat - Messung.....	63
3.6	Bestimmung von S - Nitroso - Hämoglobin.....	65
3.7	Blutungszeit.....	66
3.8	Protein - Nitrosylation.....	66
3.9	Expression der NO - Synthasen im Gehirn.....	67
<b>4</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>69</b>
4.1	Diskussion der Methode.....	69
4.1.1	Auswahl des experimentellen Trauma - Modells.....	69
4.1.2	Durchblutungsmessung mit der Laser - Doppler - Fluxmetrie.....	70
4.1.3	Durchführung der NO - Inhalation.....	72

4.2	Diskussion der Ergebnisse.....	74
4.2.1	Wirkungsmechanismus inhalierten Stickstoffmonoxids.....	74
4.2.2	Wirkung der NO - Inhalation auf den sekundären Hirnschaden.....	78
4.2.3	Intermittierende NO - Inhalation.....	85
4.2.4	Nebenwirkungen der NO - Inhalation.....	85
4.2.4.1	Mittlerer arterieller Blutdruck.....	86
4.2.4.2	Einfluss auf die Gerinnung.....	86
4.2.4.3	NO <sub>2</sub> - Gehalt.....	87
4.2.4.4	Oxidativer Schaden durch radikale Sauerstoffspezies.....	87
4.2.4.5	Einfluss auf die endogene NO - Produktion.....	88
4.2.5	Möglicher Stellenwert der NO - Inhalation in der SHT - Therapie.....	88
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung und Ausblick.....</b>	<b>91</b>
<b>6</b>	<b>Referenzen.....</b>	<b>93</b>
<b>7</b>	<b>Bereits veröffentlichte Aspekte der Arbeit.....</b>	<b>111</b>
<b>8</b>	<b>Lebenslauf.....</b>	<b>112</b>
<b>9</b>	<b>Danksagung.....</b>	<b>114</b>



# 1 Einleitung

## 1.1 Das Schädelhirntrauma

### 1.1.1 Epidemiologie und Ätiologie

„Schädelhirntrauma“ ist der Oberbegriff für gedeckte und offene Schädelverletzungen mit Gehirnbeteiligung.<sup>146</sup> Die Angaben zur Inzidenz des Schädelhirntraumas in Deutschland schwanken, was einerseits an unterschiedlichen Diagnosekriterien, andererseits an langen Rekrutierungszeiträumen bei prospektiven Studien liegt. Eine aktuellere Studie ermittelte die Inzidenz des schweren Schädelhirntraumas mit 321/ 100 000/ Jahr,<sup>373</sup> andere gehen von ungefähr 280.000 Fällen pro Jahr (entspricht 350/ 100.000) in Deutschland aus,<sup>18</sup> wovon jedoch nur in 5% (17,5/ 100.000) der Fälle schwere Schädelhirntraumata ( $GCS \leq 8$ ) vorliegen.

Die Ätiologie variiert mit dem Alter der Betroffenen. Während im jungen und mittlerem Erwachsenenalter (15-45 Jahre) Motorrad- und Autounfälle die häufigste Ursache darstellen, wird das Schädelhirntrauma bei Kleinkindern und im höheren Alter hauptsächlich durch Stürze, vor allem im häuslichen Umfeld, verursacht.<sup>18</sup> Im Rahmen eines Polytraumas kommt es ebenfalls häufig zur Mitbeteiligung des Gehirns.<sup>250</sup>

### 1.1.2 Einteilung

Das Schädelhirntrauma kann nach unterschiedlichen Gesichtspunkten eingeteilt werden: nach der Ätiologie, nach Verletzungsmechanismus, Verletzungsschwere und nach Verletzungsmuster. Bei der klinischen Beurteilung der Verletzungsschwere, die meist durch die Ersthelfer erfolgt, spielt vor allem der Grad der Bewusstseinsstörung eine Rolle. Symonds postulierte schon 1928, dass die Dauer der Bewusstlosigkeit nach einer Kopfverletzung mit der Schwere des Traumas korreliert;<sup>351</sup> 1974 wurde zur schnellen und einheitlichen Quantifizierung der Bewusstseinsstörung eine einfach durchführbare und reproduzierbare Einteilung vorgestellt, die Glasgow Coma Scale (GCS).<sup>357</sup> Diese bewertet Augenbewegungen, Sprache und Motorik; ein wacher, orientierter Patient erhält 15, ein tief komatöser Patient minimal 3 Punkte (siehe Tab. 1).

### Augenöffnung

Spontan	4
Auf Ansprache	3
Auf Schmerzreiz	2
Keine Augenöffnung	1

### Beste motorische Reaktion

Befolgung von Anweisungen	6
Gezielte Abwehrreaktion auf Schmerzreiz	5
Fluchtreaktion auf Schmerzreiz	4
Strecksynergismen auf Schmerzreiz	3
Beugesynergismen auf Schmerzreiz	2
Keine Reaktion auf Schmerzreiz	1

### Beste verbale Reaktion

Orientierte Antwort auf Fragen	5
Desorientierte Antwort auf Fragen	4
Unangemessene Antwort	3
Unverständliche Antwort	2
Keine Reaktion	1
GCS-Punktwert	3-15

Tabelle 1. Bewertung des Bewusstseinszustands mit der Glasgow-Koma-Scale

Liegt nach Trauma keine oder lediglich eine geringfügige Störung des Bewusstseins vor (GCS 15 – 13), spricht man von einem leichten oder milden Schädelhirntrauma. Die Dauer der posttraumatischen Bewusstlosigkeit liegt dabei unter zehn Minuten, meist im Sekundenbereich.<sup>112</sup> Bei diesem Verletzungstyp finden sich keine radiologisch nachweisbaren morphologischen Schäden, im Verlauf zeigen sich jedoch häufig Beeinträchtigungen des Kurzzeitgedächtnisses und der Konzentration sowie posttraumatischer Kopfschmerz.<sup>112</sup> Beim mittelschweren Trauma ist der Patient meist lethargisch und schwer erweckbar (GCS 9 – 13), die Bewusstseinsstörung dauert über eine Stunde, aber nicht länger als 24h. Beim schweren Schädelhirntrauma liegt ein tiefes Koma vor (GCS ≤ 8), das über eine Stunde andauert. Hierbei sind strukturelle Schädigungen des Hirnparenchyms

obligat; mit Spätfolgen wie posttraumatischer Epilepsie, chronisch subduralen Hämatomen und Hydrocephalus muss mit hoher Wahrscheinlichkeit gerechnet werden. Die häufigsten Verletzungsmuster sind Kontusionen und Gefäßverletzungen, die zu Subarachnoidalblutungen führen;<sup>3, 4, 298, 347</sup> diffuse axonale Schäden sowie Blutungen anderer Art (epidural, subdural, intrazerebral) werden ebenfalls beobachtet.

Weitere Klassifikationen orientieren sich am Ausmaß der Verletzungen (diffus/ fokal) und an der Mitbeteiligung der Dura mater (ist sie eröffnet, spricht man vom offenen Schädelhirntrauma, bei Unversehrtheit der Hirnhäute von geschlossener Verletzung; diese Einteilung ist vor allem für die Einschätzung des Infektionsrisikos bedeutsam) oder dem Verletzungsmechanismus: direkte spitze oder stumpfe Gewalteinwirkung ist oft mit Frakturen der Schädelknochen vergesellschaftet, Akzelerations - Dezelerationstraumata führen aufgrund von großen Beschleunigungsänderungen zu Gefäßverletzungen und Scherläsionen.

### **1.1.3 Pathophysiologie**

Nach dem Trauma kommt es im Gehirn zu zweistufig ablaufenden pathophysiologischen Veränderungen.

#### **1.1.3.1 Primärschaden**

Die Parenchymverletzung, die durch die ursprüngliche Gewalteinwirkung entsteht, wird als Primärschaden bezeichnet. Dieser wird rein durch mechanische Faktoren bestimmt und kann nur durch Prävention, nicht aber therapeutisch beeinflusst werden.<sup>251</sup> Neben der Gefäßverletzung, auf die hier nicht eingegangen werden soll, sind die beiden Hauptkomponenten dabei die Kontusion und der diffuse Axonschaden. Kontusionen gehören zu den häufigsten beobachteten Schädigungsmustern nach Trauma,<sup>347</sup> bei fast der Hälfte der Patienten mit fataler Schädel-Hirn Verletzung lassen sie sich nachweisen.<sup>298</sup> Aufgrund anatomischer Gegebenheiten finden sie sich meist an den Temporalpolen und frontobasal,<sup>3, 4</sup> da dort das Gehirn gegen die starre, scharfkantige Schädelbasis und die Sphenoidalkante gedrückt wird.

Beim diffusen Axonschaden (diffuse axonal damage) handelt es sich um radiologisch anfänglich schwer nachweisbare, asymmetrische und diffus verteilte Scherverletzungen der langen Nervenzellfortsätze bei z. T. tief bewusstlosen Patienten; diese Art der Verletzung findet sich bevorzugt im Corpus callosum und im

oberen Abschnitt des Hirnstamms.<sup>251</sup> Dies führt zu weitreichenden Veränderungen in der Neurotransmitterfunktion und im Ionengleichgewicht, was zur sofortigen Unterbrechung des axonalen Transports, zur Störung der Parenchymmetabolismus und zu Bewusstseins Einschränkungen oder -verlust führen kann.<sup>41</sup> (Eine ausführliche Zusammenfassung der Pathophysiologie des diffusen Axonschadens, auf den hier nicht näher eingegangen werden soll, findet sich bei Smith<sup>327</sup>, Sahuquillo<sup>312</sup> und Buki<sup>40</sup>). Wird die Verletzung überlebt, kommt es zum diffusen Verlust weißer Hirnsubstanz, die in einigen Fällen mit der Entwicklung posttraumatischer dementieller Symptome in Zusammenhang gebracht wurde.<sup>346</sup>

### **1.1.3.2 Sekundärer Hirnschaden**

Der eben beschriebenen Primärläsion folgen mehrere verschiedene pathophysiologische Prozesse, die in der posttraumatischen Phase zu einer Vergrößerung der Primärläsion, dem so genannten sekundären Hirnschaden, führen. Zunächst kommt es sowohl beim Patienten als auch beim Versuchstier perikontusionell zu einem starken Abfall der zerebralen Durchblutung (cerebral blood flow = CBF) auf ischämische Werte.<sup>33, 34, 37, 50, 105, 203, 226</sup> Eine starke Primärläsion kann auch zu einer globalen Senkung des CBF führen.<sup>31, 32</sup> Die Ätiologie dieses Phänomens ist nicht abschließend geklärt; in operativ gewonnenem Kontusionsgewebe zeigt sich eine Verengung der Kapillaren durch Gliazell – Schwellung sowie Verlegung der zerebralen Mikrozirkulation durch Leukozyten – und Erythrozytenaggregate.<sup>318</sup> Die ebenfalls nach Trauma beobachtete piale Vasokonstriktion bzw. der piale Vasospasmus wird unter anderem mit Endothelin 1<sup>10</sup> in Zusammenhang gebracht. Verbleibt die regionale Durchblutung unter der Ischämieschwelle (diese wird unter Berufung auf Tierexperimente mit 18ml/ 100 g Gewebe/ min angesetzt, es liegen jedoch Hinweise vor, dass sie beim traumatisierten Gehirn eventuell höher anzusetzen ist<sup>319</sup>), kommt es zu Zellnekrosen, zunächst in den Neuronen. Bleibt die Ischämie länger bestehen, sterben auch Zelltypen, die weniger vulnerabel für Minderdurchblutung sind, ab. Dies führt zu Zellschwellung, wodurch das intrakranielle Volumen steigt. Dieses Phänomen wird zytotoxisches Hirnödem genannt.<sup>251</sup> Daneben lässt sich in der posttraumatischen Phase eine gesteigerte Durchlässigkeit der Blut - Hirn -Schranke (blood brain barrier, BBB) nachweisen, die zu einer extrazellulären Flüssigkeitsansammlung führt, die als vasogenes Hirnödem bezeichnet wird.<sup>251</sup> Genauerem Überblick über die verschiedenen Typen des posttraumatischen

Hirnodems geben Unterberg et al.<sup>369</sup> Schwankungen des intrakraniellen Volumens können ausgeglichen werden: die Monro – Kellie – Doktrin besagt, dass das intrakranielle Gesamtvolumen, das im Schädel durch die drei Kompartimente Gehirnparenchym, zerebrales Blutvolumen und Liquor cerebrospinalis bestimmt wird, konstant gehalten wird.<sup>260, 267, 340</sup> Deswegen können auch pathologische Raumforderungen im Gehirn anfänglich kompensiert werden: sie verdrängen zunächst Liquor und Blut; wenn die Kapazitätsreserven („je nach Alter sind nur 40 – 80 ml Liquor verdrängbar“,<sup>263</sup> S.224) aufgebraucht sind, steigt in der starren Schädelkapsel der intrakranielle Drucks (intracranial pressure, ICP) exponential an (Abbildung 1).

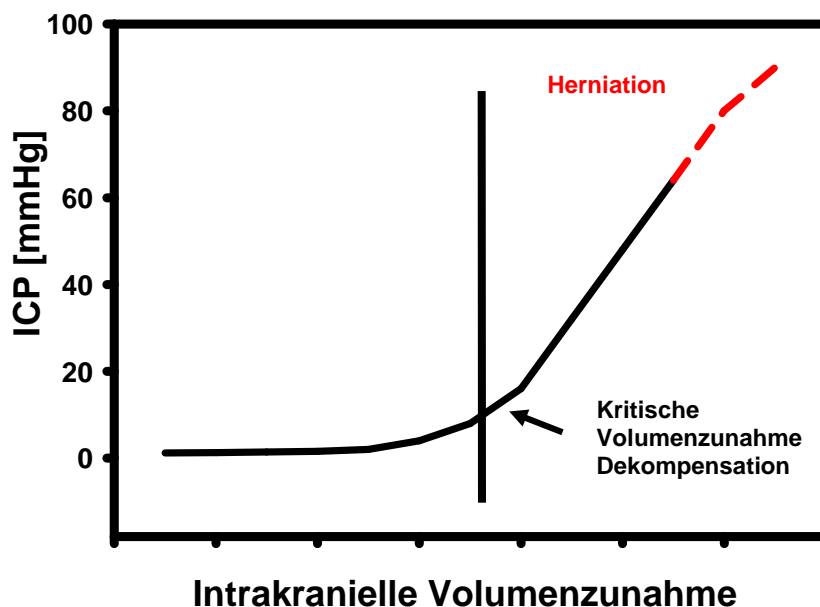


Abbildung 1: Zusammenhang zwischen intrakranieller Volumenzunahme und intrakranielltem Druck

Durch den hohen ICP verringert sich der zerebrale Perfusionsdruck (cerebral perfusion pressure, CPP), der sich aus der Differenz zwischen dem mittleren arteriellen Blutdruck (mean arterial pressure, MAP) und dem intrakraniellen Druck errechnet. Kann das Hirngewebe aufgrund zu niedrigem CPP nicht mehr durchblutet werden, kann der Energiestoffwechsel der Zelle nicht aufrecht erhalten werden; man spricht von Ischämie. Dies führt wiederum zu vermehrten zytotoxischen Vorgängen und somit zur Verstärkung der intrakraniellen Hypertension. Außerdem hat der hohe ICP auch eine Beeinträchtigung des venösen Abflusses zur Folge; das intrakranielle Blutvolumen (cerebral blood volume, CBV) steigt, wodurch sich auch der Hirndruck erhöht. Im Verlauf führen die oben genannten Prozesse zu einem „circulus vitiosus“,

die ursprüngliche Läsion expandiert über einen Zeitraum von mehreren Tagen. Überschreitet der intrakranielle Druck (unter physiologischen Bedingungen 5-18 cmH<sub>2</sub>O oder 3-13 mmHg)<sup>263</sup> einen Schwellenwert (der genaue Grenzwert ist umstritten, Werte von 20 – 25 mmHg werden allgemein als kritisch betrachtet), droht die Herniation des Hirngewebes. Die axiale transtentorielle Herniation (siehe Abb. 2, 2 und 3), bei der Di- und Mesenzephalon durch den Tentoriumsschlitz gedrückt werden, bedroht das Leben des Patienten akut; auch andere Formen der Herniation sind möglich (Abbildung 2, siehe dazu auch Mumenthaler, M.,<sup>263</sup> S. 222 - 224).

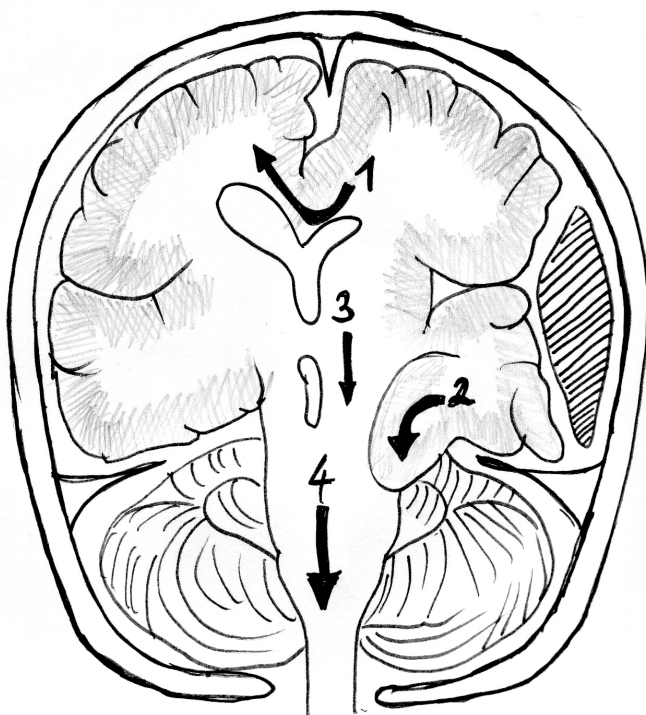


Abb. 2: Formen der Herniation bei intrakranieller Hypertension: 1. Subfalcine Herniation des Gyrus cinguli unter die Falx cerebri. 2. Herniation des Unus durch den Tentoriumsschlitz. 3. Axiale transtentorielle Herniation des Hirnstamms. 4. Herniation der Kleinhirntonsillen durch das Foramen magnum. Modifiziert nach Jennet, WB; Teasdale, G.(1981): Management of severe head injuries, Ed. 2, FA Davis Company, Philadelphia.

Posttraumatisch kommt es auch zu Elektrolyt - und Neurotransmitterveränderungen. Aufgrund von Gewebeuntergang kommt es peritraumatisch zu einem Anstieg der Kaliumkonzentration.<sup>182, 354</sup> Glutamat ist ebenfalls bis mehrere Tage nach Trauma erhöht.<sup>182, 277, 320</sup> Außerdem kommt es zur gesteigerten Produktion freier Radikale,<sup>63, 329</sup> worunter auch NO fällt.<sup>65, 231</sup> Letzteres wirkt wahrscheinlich durch seinen Abkömmling Peroxynitrit (ONOO<sup>-</sup>) neurotoxisch<sup>63</sup> und spielt eine Rolle in der Glutamat - vermittelten Neurotoxizität.<sup>231</sup>

Extrazerebrale Faktoren wie Hypoxämie unterschiedlicher Genese,<sup>51</sup> systemische Hypotension<sup>51</sup> und Hyperthermie<sup>41, 332</sup> sowie zerebrale Blutungen sind bei vielen

Patienten mit schwerem SHT nachweisbar. Sie erhöhen die Mortalität stark, z.B. verdoppelt sich die Mortalität, wenn vor Klinikeinweisung systemische Hypotension von unter 90 mmHg<sup>51</sup> oder Hypoxämie vorliegt,<sup>51, 384</sup> und begünstigen den sekundären Hirnschaden.

### **1.1.3.3 Bedeutung einzelner Parameter für die Prognose nach SHT**

Eine aktuelle Metaanalyse<sup>266</sup> (zusammengefasst wurden 11 Studien mit insgesamt über 8600 Patienten) kommt zu dem Schluss, dass die aussagekräftigsten klinischen Kriterien für eine schlechte Prognose nach Schädelhirntrauma ein höheres Alter (über 60 Jahre), der GCS Wert (v.a. für die Motorik), die Pupillenreaktion und der Befund beim Aufnahme - Computertomogramm sind. Eine effektive Therapie sollte jedoch nicht nur symptomatisch sein, sondern die den klinischen Symptomen zugrunde liegenden Mechanismen abmildern.

Wie oben erwähnt, kommt der zerebralen Ischämie eine zentrale Rolle in der Pathophysiologie des Schädelhirntraumas zu; sie hat darüber hinaus auch starke prognostische Bedeutung: Nachweis von Durchblutungswerten unter 18 ml pro 100 g Hirngewebe und Minute innerhalb der ersten 24 Stunden nach Trauma sind immer ein schlechter prognostischer Faktor.<sup>31-34, 175, 176, 274</sup> Das neurologische Outcome verschlechtert sich weiterhin, je länger die Durchblutung kompromittiert ist.<sup>188</sup> Zudem finden sich bei fast allen Patienten mit tödlichem Schädelhirntrauma Zeichen der Ischämie.<sup>125</sup>

Eine kausale Therapie des SHT muss also unter anderem versuchen, diese Mangel durchblutung zu bekämpfen bzw. die Durchblutung in gefährdeten Hirnarealen zu verbessern, um dadurch das sekundäre Nekrosewachstum zu vermindern.

## **1.2 Stickstoffmonoxid (NO) und seine Anwendung**

### **1.2.1 Allgemeines**

Bereits 1846 gelang es dem Turiner Chemiker Ascànio Sobréro, den NO - Vorläuferstoff Nitroglycerin zu synthetisieren;<sup>241</sup> später konnte Alfred Nobel sich dessen industrielle Herstellung patentieren lassen.

Seit seiner Erfindung findet Nitroglycerin in Form von Dynamit vielfältige Anwendungen, man machte sich aber auch schnell auch die medizinische Wirkung dieser neuen Substanz zu Nutze. Schon bei der Erstvorstellung der Substanz berichtete Sobréro, dass das Einnehmen selbst geringster Mengen einen Stunden

andauernden starken Kopfschmerz hervorrief.<sup>158</sup> Gegen Ende des 19. Jahrhunderts war die blutdrucksenkende und durchblutungsfördernde Wirkung verschiedener NO - Derivate bereits erforscht, das *Boston Medical and Surgical Journal* propagierte 1888 Nitroglycerin als Standardtherapeutikum bei pektanginösen Beschwerden.<sup>1</sup> Alfred Nobel selbst empfand es Berichten zufolge als „Ironie des Schicksals“, dass ihm gerade diese Substanz, deren Weiterentwicklung er in späteren Jahren aufgrund ihrer Zerstörungskraft bereute, 1896 gegen Angina pectoris verschrieben wurde.<sup>189,</sup>  
241

Trotz der weiten Verbreitung war der exakte Wirkmechanismus von Stickstoffmonoxid lange Zeit unbekannt; erst gut 100 Jahre später konnte bewiesen werden, dass der für die Gefäßweitenregulierung bedeutende „Endothelium-derived relaxing factor“, der die durch Acetylcholin verursachte Vasodilatation vermittelt und der nur an intaktem Gefäßendothel wirkt<sup>98-101</sup>, mit Stickstoffmonoxid identisch ist.<sup>97,</sup>  
166-171, 174, 265, 276

Für diese Entdeckung wurden Louis J. Ignarro, Robert F. Furchgott und Ferid Murad 1998 mit dem Nobelpreis für Physiologie und Medizin ausgezeichnet.

Stickstoffmonoxid ist ein farbloses, lösliches Gas mit sehr kurzer biologischer Halbwertszeit<sup>113, 299, 338</sup>, das endogen gebildet wird und auf glatte Muskelzellen stark vasodilatierend wirkt<sup>169, 276</sup>, indem es die Aktivität der löslichen Guanylat-Cyclase und dadurch die intrazellulären cGMP-Spiegel erhöht<sup>11</sup>. cGMP spielt als second messenger durch Phosphorylierung eine wichtige Rolle in vielen intrazellulären Signalwegen;<sup>223, 264</sup> daneben kann NO auch cGMP-unabhängig Calcium-abhängige Kalium-Kanäle aktivieren.<sup>28</sup>

Im Körper wird NO durch eine Isoenzymgruppe, den NO –Synthasen, aus der semiessentiellen Aminosäure L - Arginin gebildet.<sup>101, 168, 275</sup> Um enzymatisch aktiv zu werden, müssen 2 NOS - Moleküle ein Dimer bilden. Als essentieller Kofaktor für die Dimerisierung fungiert dabei Tetrahydrobiopterin (BH<sub>4</sub>).<sup>331</sup>

Die beiden konstitutiven NOS (cNOS), die endotheliale Form (eNOS, Typ I) und die neuronale NOS (nNOS, Typ III), produzieren NO in Abhängigkeit vom intrazellulären Kalzium-Spiegel;<sup>54, 87, 201, 295</sup> zudem wird für die Synthese NADPH als Kofaktor und Calmodulin benötigt.<sup>35, 42, 295</sup> Die induzierbare NO-Synthase (iNOS, Typ II) kann NO unabhängig vom Ca-Spiegel synthetisieren.<sup>54, 87</sup> Alle drei Isoformen lassen sich im Gehirn nachweisen.<sup>38, 102, 103, 165, 211, 305, 375, 382</sup>

Neben der Regulation der vaskulären Homöostase ist Stickstoffmonoxid an zahlreichen Prozessen beteiligt: Unter anderem ist NO unter physiologischen und



pathophysiologischen Bedingungen ein Modulator der Thrombozyten - Aktivität<sup>212, 289, 290, 336</sup> sowie der Leukozytenadhäsion (in vitro<sup>316</sup> und in vivo<sup>6, 96, 181, 208, 232, 243, 269, 271</sup>), es wirkt antiproliferativ,<sup>11, 104, 223, 353</sup> trägt über eine Modulierung der „endothelial junctions“ zur Regulation der Gefäßpermeabilität bei.<sup>83, 273</sup>

Einige pathophysiologische Prozesse gehen mit erniedrigter endogener NO-Produktion einher, darunter Atherosklerose,<sup>229, 278, 288, 308, 324</sup> arterielle Hypertension<sup>278</sup> und chronische Nierenerkrankungen.<sup>199, 200</sup>

## **1.2.2 Die Rolle von NO im Gehirn**

### **1.2.2.1 Physiologische Aufgaben von NO im ZNS**

In vielen experimentellen und klinischen Studien wurde gezeigt, dass NO unter physiologischen Bedingungen im Gehirn eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung der Ruhedurchblutung spielt.

Dies scheint hauptsächlich durch das von eNOS produzierte NO zu geschehen;<sup>16, 123, 155, 162, 355, 381, 387</sup> es gibt jedoch auch Hinweise für eine Beteiligung der neuronalen NO-Synthase an diesem Vorgang.<sup>55, 123, 157, 368</sup>

Darüber hinaus ist NO für die zerebrale Autoregulation notwendig<sup>157, 202, 356, 381, 382</sup> und trägt zur Reaktion der Gehirngefäße auf Hyperkapnie bei.<sup>160</sup>

Eine weitere wichtige Funktion von NO scheint die Anpassung der zerebralen Durchblutung an das Aktivitätsniveau des Gehirns zu sein: Im vorderen Teil des Circulus willisi finden sich perivaskuläre Plexus NOS-haltiger Nervenzellen, die mit Arteriolen und Kapillaren assoziiert sind.<sup>161</sup> Hier scheint NO an der Anpassung der lokalen zerebralen Durchblutung an das Aktivitätsniveau beteiligt zu sein, worauf *in vitro*<sup>71</sup> und *in vivo* Studien<sup>55</sup> hinweisen.

NO fungiert zudem als exzitatorischer Neurotransmitter,<sup>63, 64</sup> der in postsynaptischen Strukturen synthetisiert wird und wahrscheinlich über den NMDA - Rezeptor wirkt,<sup>106, 107</sup> außerdem werden ihm neuroprotektive<sup>132</sup> und antikonvulsive Qualitäten<sup>377</sup> zugeschrieben. NO scheint zudem an der Aufrechterhaltung der Blut - Hirn - Schranke beteiligt zu sein.<sup>53</sup>

### **1.2.2.2 Die Rolle von NO bei zerebralen Insulten**

Nach experimenteller fokaler zerebraler Ischämie kommt es zunächst zu einem kurzen, Sekunden bis mehrere Minuten andauernden Anstieg der NO - Konzentration (von unter 10 nM auf 1,5 µM ),<sup>180, 392</sup> in der Folge ist die NO - Konzentration gegenüber gesunden Tieren deutlich erniedrigt.<sup>322, 348, 368</sup> In der

Reperusionsphase steigt der NO – Gehalt wieder an.<sup>321, 346, 366</sup> Dieser Befund geht mit einer Aktivitätsabnahme der konstitutiven NO - Synthase - Isoformen (eNOS, nNOS)<sup>126, 389</sup> und einer Zunahme der iNOS – Aktivität<sup>88, 163, 164, 322, 368</sup> einher. Die NO - Produktion durch die verschiedenen Isoformen hat unterschiedliche Auswirkungen auf die postischämische Pathyphysiologie: Wird die iNOS - Aktivierung durch die Verwendung von Inhibitoren oder iNOS defiziente Tiere verhindert, bewirkt dies eine deutliche Neuroprotektion.<sup>165, 282, 393</sup> Dagegen zeigen eNOS knockout Tiere niedrigere Durchblutungswerte und größere Infarkt volumina,<sup>155, 227</sup> wobei zu bemerken ist, dass innerhalb der Infarkte der Core - Bereich größer und die Penumbra kleiner ist als bei eNOS - exprimierenden Tieren.<sup>227</sup>

Nach Schädelhirntrauma verhält sich die NO - Konzentration ähnlich wie nach fokaler zerebraler Ischämie: Es kommt ebenfalls zu einem sehr kurzen, starken Anstieg, gefolgt von einer länger dauernden Abnahme,<sup>47-49</sup> die wiederum von einer Aktivitätsabnahme der cNOS im Parenchym der traumatisierten Hemisphere begleitet wird.<sup>374</sup>

Gleichzeitig kommt es beim Menschen<sup>103</sup> und im Tierexperiment<sup>102, 376</sup> zu einem Anstieg von iNOS - Aktivität und - Expression; iNOS - Inhibition ist auch bei diesem Krankheitsbild neuroprotektiv.<sup>301, 344, 376</sup>

Durch systemische oder topische Zufuhr von L - Arginin, dem direkten NO - Vorläufer, steigt die posttraumatische zerebrale Durchblutung;<sup>46, 49</sup> das Nekrosevolumen ist kleiner als bei unbehandelten Tieren.<sup>150</sup>

Eine Beeinflussung des NO - Metabolismus erscheint also als durchaus sinnvoll, um die pathophysiologischen Folgen des Schädelhirntraumas zu mindern.

### **1.2.3 NO als therapeutisches Zielmolekül**

Stickstoffmonoxid fand – wie bereits erwähnt – früh Einsatz als Medikament. Organische Nitrate und Nitratderivate sind auch heute noch Standardmedikamente bei der Therapie der koronaren Herzkrankheit. Die Europäische Gesellschaft für Kardiologie empfiehlt in ihren Leitlinien<sup>90</sup> kurzwirksame NO - Derivate zur Behandlung des akuten Myokardinfarkts sowie des akuten Angina pectoris – Anfalls und länger wirksame Nitrate zur Anfallsprophylaxe. Daneben wird die vasodilatatorische Komponente systemischer NO - Derivate auch bei spastischer Migraine und Gallenwegskoliken genutzt.

Die Therapie mit NO - Donatoren ist jedoch mit zum Teil schwerwiegenden systemischen Nebenwirkungen besetzt. Die immer auftretende systemische

Hypotension wird nur in seltenen Fällen symptomatisch,<sup>358</sup> der wahrscheinlich durch Dilatation extrakranieller Arterien verursachte Kopfschmerz ist die am häufigsten auftretende Beschwerde; er kann als sehr unangenehm empfunden werden und ist der häufigste Grund für Therapieabbrüche.<sup>358</sup>

Eine weitere Schwierigkeit der NO - Therapie ist die schnelle Ausbildung einer „Nitrat - Toleranz“: bei kontinuierlicher systemischer Anwendung kommt es innerhalb 24h zu Wirkungsabschwächung und -verlust dieser Medikamentengruppe.<sup>27, 280, 281</sup>

Anfallsweise auftretende Angina pectoris spricht dennoch gut auf Nitrate an, solange auf ein ausreichend langes therapiefreies Intervall geachtet wird.

Eine andere Gruppe von Erkrankungen, die ebenfalls durch eine pathologische Vasokonstriktion gekennzeichnet ist, spricht dagegen schlecht auf die Nitrat - Gabe an: Werden bei pulmonaler Hypertonie egal welcher Genese systemische NO - Donatoren oder auch andere Vasodilatoren (Prostaglandine,  $\alpha$  -Rezeptorblocker) verabreicht, kommt es im systemischen und im Lungenkreislauf gleichermaßen zu einer Vasodilatation,<sup>247, 248, 310, 311, 330, 341</sup> dies verschlechtert meist die hämodynamische Situation der Patienten. Zudem ist bei pulmonaler Hypertonie eine länger andauernde, kontinuierliche Therapie notwendig.

Auf der Suche nach einer Möglichkeit, eine selektiv pulmonale Vasodilatation zu erreichen, versuchte man die inhalative Anwendung von Stickstoffmonoxid als Gas.

### **1.2.3.1 NO - Inhalation**

1991 beobachtete Frostell, dass beim Versuchstier inhaliertes NO durch Hypoxie verursachte pulmonale Vasokonstriktion selektiv aufhebt, ohne eine Wirkung auf den systemischen Kreislauf zu haben.<sup>94</sup> Bei gesunden Tieren zeigte iNO keine Wirkung. Diese Ergebnisse konnten von mehreren Gruppen in unterschiedlichen Tiermodellen bestätigt werden.<sup>93, 147, 183, 309, 363</sup>

Noch im gleichen Jahr zeigte Pepke - Zaba, dass die NO - Inhalation auch beim Menschen selektiv und effektiv den Lungengefäßwiderstand senkt,<sup>286</sup> und zwar ohne Wirkung auf den peripheren Widerstand.

In den darauf folgenden Jahren wurde die NO - Inhalation intensiv auf ihre Wirksamkeit bei unterschiedlichen Indikationen untersucht: Erwachsene Patienten mit pulmonaler Hypertonie jeder Genese (primäre pulmonale Hypertonie,<sup>218, 286</sup> sekundäre pul. Hypertonie,<sup>206, 352</sup> ARDS,<sup>24, 279, 307</sup> pulmonaler Hypertonus nach Bypass- oder anderen Herzoperationen<sup>80, 81, 379</sup> ) profitierten deutlich von der Behandlung. Noch bessere Ergebnisse ließen sich bei Neugeborenen erzielen: bei

zirka 2% aller lebend geborenen Kinder tritt innerhalb der ersten Lebensstunden ein akutes Atemnotsyndrom (acute respiratory distress syndrome, ARDS) auf (zur Ätiologie und Pathogenese des neonatalen ARDS siehe Dakshinamurti,<sup>62, 372</sup> und Gnanaratnem<sup>119</sup>). Die wirksamste Behandlung dieser Erkrankung bestand zuvor in der äußerst invasiven und mit starken Nebenwirkungen behafteten extrakorporalen Membranoxygenierung (ECMO<sup>19</sup>). Bei diesen Patienten konnte durch die NO - Inhalation eine deutliche und andauernde Verbesserung der Oxygenierung erreicht werden.<sup>66, 84, 193, 194, 302, 304, 306, 380</sup> In Langzeituntersuchungen zeigten die so behandelten Kinder keine Spätschäden der Therapie.<sup>122, 196, 306</sup>

In einer 2006 veröffentlichten Metaanalyse aller relevanten Studien kommen Finer und Barrington zu dem Schluss, dass bei reifen Neugeborenen mit hypoxischem Lungenversagen die Stickstoffmonoxid - Inhalation (in einer Dosierung von 20 ppm) die Therapie der Wahl ist (wenn die Kinder nicht an einer angeborenen Zwerchfellhernie leiden).<sup>85</sup>

Im Zuge der Erforschung inhalierten NOs zeigten sich auch positive Auswirkungen von iNO auf Herzerkrankungen: nach Herzinfarkt führt seine Anwendung zu verbesserter Pumpleistung,<sup>147, 173, 333</sup> außerdem verbessert es die hämodynamische Situation bei angeborenen Herzfehlern.<sup>300, 303</sup> Diese Ergebnisse wurden jedoch nicht als direkte NO - Wirkung auf das Herz interpretiert, sondern als sekundäres Phänomen aufgrund von verringertem Lungengefäßwiderstand und besserer Oxygenierung.<sup>147</sup>

Mit der weiteren Verbreitung und Anwendung inhalierten NOs wurde auch intensiver nach extrapulmonalen Wirkungen bzw. Nebenwirkungen der NO - Inhalation gesucht. Dem Konzept der lokal begrenzten, pulmonalen Selektivität der Stickstoffmonoxid - Wirkung widersprachen Beobachtungen in lungenfernen Gefäßbetten. Außerdem ergaben sich neue Erkenntnisse über die NO - Hämoglobin - Interaktion (siehe 1.2.3.3), die darauf hindeuteten, dass aktives NO von der Lunge in die Peripherie gelangen und dort wirken kann.

### **1.2.3.2 Extrapulmonale Wirkungen der NO - Inhalation**

Der große Vorteil der NO - Inhalation zur Behandlung der pulmonalen Hypertonie besteht darin, dass sie die systemische Durchblutung im Gegensatz zu allen anderen Vasodilatoren unbeeinflusst lässt, also nicht zur systemischen Hypotonie führt. Die Mehrheit der experimentellen<sup>25, 191, 210, 363</sup> und klinischen<sup>43, 95, 173, 279, 303</sup> Studien zur

Wirkung von iNO berichtet keine Senkung des Blutdrucks, eine Fallstudie berichtet sogar von einer Steigerung unter 35ppm Stickstoffmonoxid.<sup>371</sup> In anderen Untersuchungen trat eine Senkung des systemischen Blutdrucks auf,<sup>66, 153</sup> die jedoch nur bei hohen Dosen (300ppm) signifikant nachzuweisen war.<sup>153</sup>

1997 zeigte Troncy, dass NO - Inhalation die Nierendurchblutung, die glomeruläre Filtrationsrate und den Urinfluß signifikant verbessert, ohne dass dies durch Veränderungen der systemischen Durchblutung zu erklären ist.<sup>365</sup>

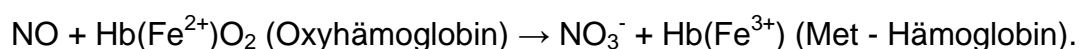
Zudem konnte in mehreren Studien nachgewiesen werden, dass iNO nicht nur in der Lunge,<sup>52</sup> sondern auch in anderen kapillären Stromgebieten<sup>91, 268</sup> die Leukozytenadhäsion hemmt und antiinflammatorisch wirkt.<sup>79, 195</sup>

Ob die NO - Inhalation die Gerinnung beeinträchtigt oder nicht, wird momentan noch kontrovers diskutiert. Während einige Untersucher zu dem Ergebnis kommen, dass die Blutungszeit signifikant verlängert wird,<sup>108, 152, 153, 190</sup> beobachten andere keine oder nur geringfügige Veränderungen.<sup>7, 8, 207, 315</sup> Dasselbe gilt für die Frage, ob und inwiefern die Thrombozytenfunktion beeinträchtigt wird<sup>128, 129, 153</sup> oder nicht.<sup>7, 8, 108, 207</sup>

Dennoch gibt es deutliche Anzeichen für eine über die Lunge herausgehende Wirkung inhalierten Stickstoffmonoxids. Dies wirft die Frage auf, wie NO in die Peripherie gelangt.

### **1.2.3.3 Mögliche Wirkmechanismen inhalierten Stickstoffmonoxids**

Lange galt es als Dogma, dass NO – auf welche Weise es auch immer verabreicht wird – lediglich regional begrenzte Wirkungen im Körper haben kann, da es augenblicklich von Oxyhämoglobin zu Nitrat umgewandelt und somit inaktiviert wird:<sup>77, 78, 143</sup>



Diese Eigenschaft des Hb wurde sogar herangezogen, um die Identität von EDRF mit NO zu belegen;<sup>169</sup> viele weitere Untersuchungen legten den Schluss nahe, dass die NO-Hämoglobin-Interaktionskinetik eher für eine NO-Inaktivierung als für eine Bewahrung der NO – Bioaktivität spricht.<sup>77, 78, 143, 144</sup>

Die anfänglich beobachtete rein pulmonale Wirkung der NO - Inhalation schien die Inaktivations – Theorie zu bestätigen,<sup>299</sup> da die Lungenzirkulation den größten Pool an Oxyhämoglobin darstellt.

Die Gruppe um Jonathan Stamler propagierte Mitte der 90er Jahre, dass Hämoglobin die Bioaktivität des NO bewahren und weitertransportieren kann, indem es an einen Cystein - Rest der  $\beta$  – Untereinheit ( $\beta$  - 93 - Cys) bindet.<sup>124, 179, 335</sup> Das so

entstandene S - Nitroso - Hämoglobin kann dann das gebundene NO direkt freisetzen oder Plasmaproteine<sup>284, 386</sup> nitrosylieren, die es dann abgeben; aufgrund einer Konformationsänderung im Hämoglobin - Molekül geschieht diese Freisetzung bevorzugt in Gebieten mit niedriger Sauerstoffspannung, da die Nitrosylbindung durch eine Strukturänderung des Hb beim Übergang vom Oxy - in den Desoxyzustand geschwächt wird.<sup>179, 245, 335</sup> Diese Theorie wird durch das Vorhandensein eines arteriovenösen Gradienten für S - NO - Hb<sup>179, 245</sup> unterstützt.

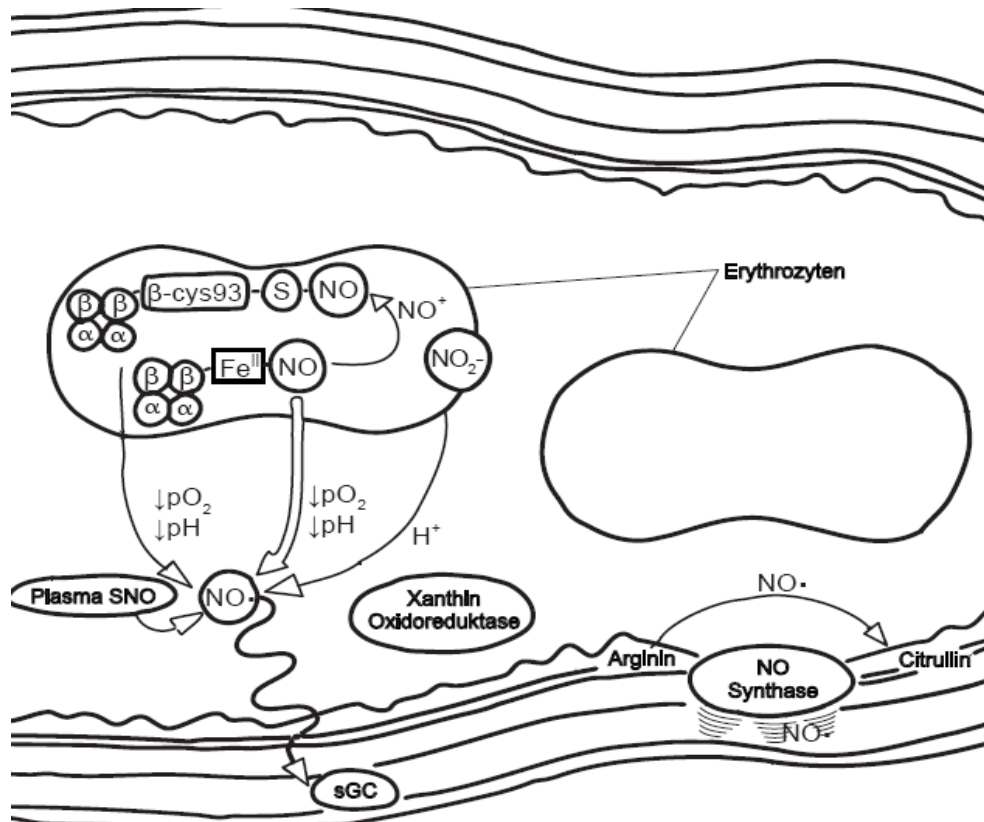


Abb. 3. Übersicht über mögliche NO - Wirkungen:

Rechts ist die physiologische Synthese von NO aus Arginin dargestellt, die in den Endothelzellen stattfindet. NO kann nicht mit den Erythrozyten in Kontakt kommen, da zwischen korpuskulären Blutbestandteilen und der Gefäßwand eine schmale Plasmanschicht als Diffusionsbarriere (gelb dargestellt) fungiert.

Links: Die Wirkung pharmakologisch zugeführter NOs. NO kann innerhalb des Erythrozyten an die  $\beta$  - Untereinheit ( $\beta$  - Cys 93) des Hämoglobins binden und S - Nitrosohämoglobin bilden. NO kann dann in Regionen mit niedrigem Sauerstoffpartialdruck/ niedrigem pH aufgrund einer Konformationsänderung des Hb freigesetzt werden. Eine weitere Möglichkeit des NO - Transports im Blut ist die Nitrosylierung von Plasmaproteinen wie Albumin. Die so entstandenen nitrosylierten Proteine (Plasma SNO) setzen NO in Regionen mit niedrigem Sauerstoffpartialdruck/ niedrigem pH frei. NO diffundiert dann zur Gefäßwand, wo es die lösliche Guanylat - Zyklase (sGC) aktiviert und zur Relaxation der glatten Muskelzellen führt. Eine dritte Möglichkeit der NO - Freisetzung besteht im Reaktionsweg über Nitrit ( $\text{NO}_2^-$ ): Nach Reaktion von NO mit (Oxy)Hämoglobin entsteht Nitrit und Met - Hämoglobin. Im Plasma kann  $\text{NO}_2^-$  dann von durch die Xanthin - Oxidoreduktase zu NO reagieren; diese Reaktion wird wiederum durch einen niedrigen  $\text{pO}_2$  und pH begünstigt. Es wird propagiert, dass Desoxy - Hämoglobin auch Nitrit - Reduktase - Aktivität zeigen kann.

Modifiziert nach: Schechter A.N., Gladwin M.T. (2003) *Hemoglobin and the paracrine and endocrine functions of nitric oxide*. N.Engl.J.Med. 348:1483-1485

Dieser Befund wurde jedoch von anderen Untersuchern nicht bestätigt;<sup>115, 118, 292</sup> aufgrund dessen und wegen anderer Überlegungen wurden andere Reaktionswege vorgeschlagen:

NO kann unter physiologischen Bedingungen schnell zu Nitrit reagieren (siehe Formel oben). Unter iNO kommt es ebenfalls zu einem Anstieg von Plasma - Nitrit;<sup>116</sup> außerdem wurde sowohl unter physiologischen Bedingungen<sup>56, 117</sup> als auch unter NO - Inhalation<sup>43</sup> ein arteriovenöser Gradient für Nitrit nachgewiesen.

Ähnlich wie S - NO - Hb kann auch Nitrit die Bioaktivität von NO bewahren.<sup>398</sup>

Einerseits kann Desoxyhämoglobin als Nitrit - Reduktase fungieren und Nitrit zu NO umwandeln,<sup>114</sup> andererseits existieren auch enzymatische und nichtenzymatische Reaktionswege, welche beide bevorzugt bei niedrigem pO<sub>2</sub> und pH - Wert ablaufen.<sup>120, 220, 256, 257, 391, 396, 398</sup> Somit würde auch durch diesen Mechanismus die Stickstoffmonoxid - Wirkung bevorzugt in hypoxischen Arealen auftreten.

Die Debatte darüber, wie genau endogenes und auch von außen zugeführtes NO im Körper wirkt, ist jedoch bei weitem nicht abgeschlossen (Übersicht über die Thematik bieten unter anderem <sup>61, 115, 151, 283, 317</sup> und <sup>245</sup>, eine schematische Übersicht der propagierten Mechanismen bietet Abbildung 3).

#### **1.2.3.4 NO - Inhalation und Gehirn**

In verschiedenen Patientenberichten wurde über zerebrale Nebenwirkungen der NO - Inhalation berichtet. Bei Neugeborenen, die aufgrund eines angeborenen Herzfehlers und ARDS mit NO behandelt wurden, kam es zu sofort nach Absetzen der Therapie reversiblen EEG - Veränderungen (background slowing, low voltage, suppression burst, sharp waves).<sup>179, 259</sup>

Im Tierversuch konnte dieser Effekt der NO - Inhalation (unter 2 – 60 ppm NO) nicht nachgewiesen werden.<sup>228</sup>

Tsai und Gastfriend<sup>366</sup> berichten von einer lungentransplantierten Patientin, bei der es nach NO - Inhalationstherapie zum Auftreten einer generalisierten Motoneuron - Erkrankung mit elektromyographisch nachweisbarer ausgedehnter Denervierung kam. Andere Autoren bezweifelten jedoch den ätiologischen Zusammenhang der Erkrankung mit der iNO - Gabe.<sup>127</sup>

Ein weiterer umstrittener Punkt ist, ob die NO - Inhalation bei Neugeborenen zu einer erhöhten Inzidenz intrazerebraler Blutungen führt.<sup>52, 196, 254</sup>

In mehreren Studien wurden die längerfristigen Wirkungen und das Outcome nach NO - Inhalationstherapie untersucht. Bis zu drei Jahre nach NO - Inhalation ließ sich

bei den behandelten Kindern keine höhere Rate an neurologischen Erkrankungen (Behinderung, motorische und geistige Entwicklungsverzögerung, Auftreten von epileptischen Anfällen) nachweisen.<sup>2, 52, 122, 224, 306</sup>

Eine aktuelle Metaanalyse der Cochrane Library<sup>85</sup> kommt ebenfalls zu diesem Ergebnis; in einer untersuchten Studie litten die iNO - therapierten Patienten sogar seltener an epileptischen Anfällen als die Kontrollgruppe.<sup>85</sup>

Die meiste Aufmerksamkeit wurde bei derartigen Untersuchungen der zerebralen Durchblutung zuteil: In tierexperimentellen Studien<sup>52, 210, 228</sup> konnte mit unterschiedlichen Methoden kein Einfluss der NO - Inhalation auf die zerebrale Durchblutung (CBF) aufgezeigt werden; indirekt könne sie aber durch iNO verursachte Änderungen im CO<sub>2</sub> - Partialdruck beeinflusst werden.<sup>228</sup> In einer Fallstudie zeigte sich bei einem Kind mit pulmonaler Hypertonie und Schädelhirntrauma keine Änderung des CBF unter NO - Inhalation.<sup>371</sup>

Kübler<sup>209</sup> konnte jedoch nachweisen, dass es trotz gleich bleibender zerebraler Durchblutung unter NO - Inhalation zu einer reversiblen, dosisabhängigen Steigerung des zerebralen Blutvolumens kommt (Abbildung 4). Dies ist am ehesten mit einer Dilatation der Venen, der zerebralen Kapazitätsgefäße, in Einklang zu bringen.

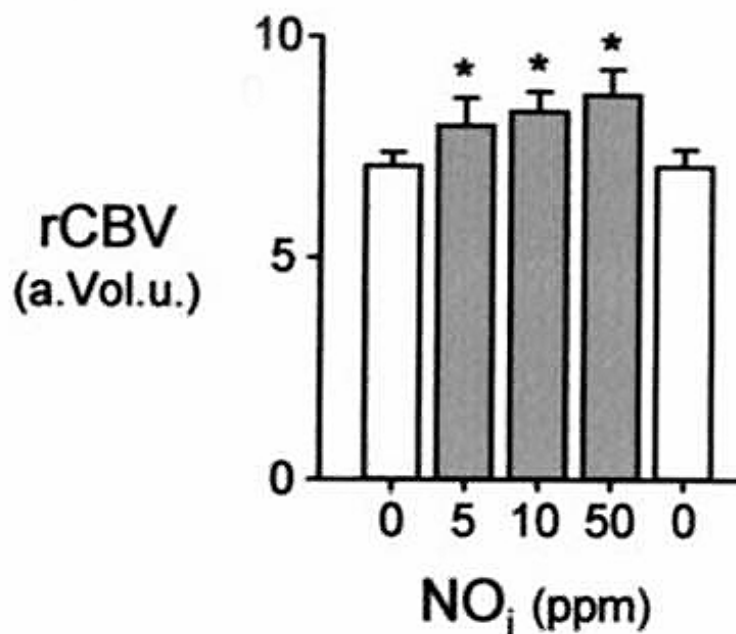


Abb. 4: Zerebrovaskuläre Effekte der NO - Inhalation in Schweinen. Es zeigt sich eine deutliche dosisabhängige Wirkung der NO - Inhalation auf das zerebrale Blutvolumen (regional cerebral blood volume, rCBF). aus: Kuebler WM et al. (2003) *Inhaled nitric oxide induces cerebrovascular effects in anesthetized pigs*. *Neurosci.Lett.* 348:85-88.



Um diese gezielt nachzuweisen führten wir in unserer Arbeitsgruppe Experimente durch, in denen der venöse Gefäßdurchmesser pialer Gefäße bei der Maus mittels der Intravitalmikroskopie bestimmt wurde. Die zerebrale Durchblutung blieb während des gesamten Experiments gleich (Abbildung 5a), da sich der arterioläre Durchmesser nicht veränderte (Abbildung 5b). Im venösen Abschnitt des Gefäßsystems zeigte sich dagegen kurz nach Beginn der NO - Inhalation eine signifikante Dilatation (Abbildung 5c: Originalbild, 5d: Quantifizierung), was die Hypothese bestätigte, dass die NO - Inhalation in der zerebralen Zirkulation zu einer selektiven venösen Dilatation führt.

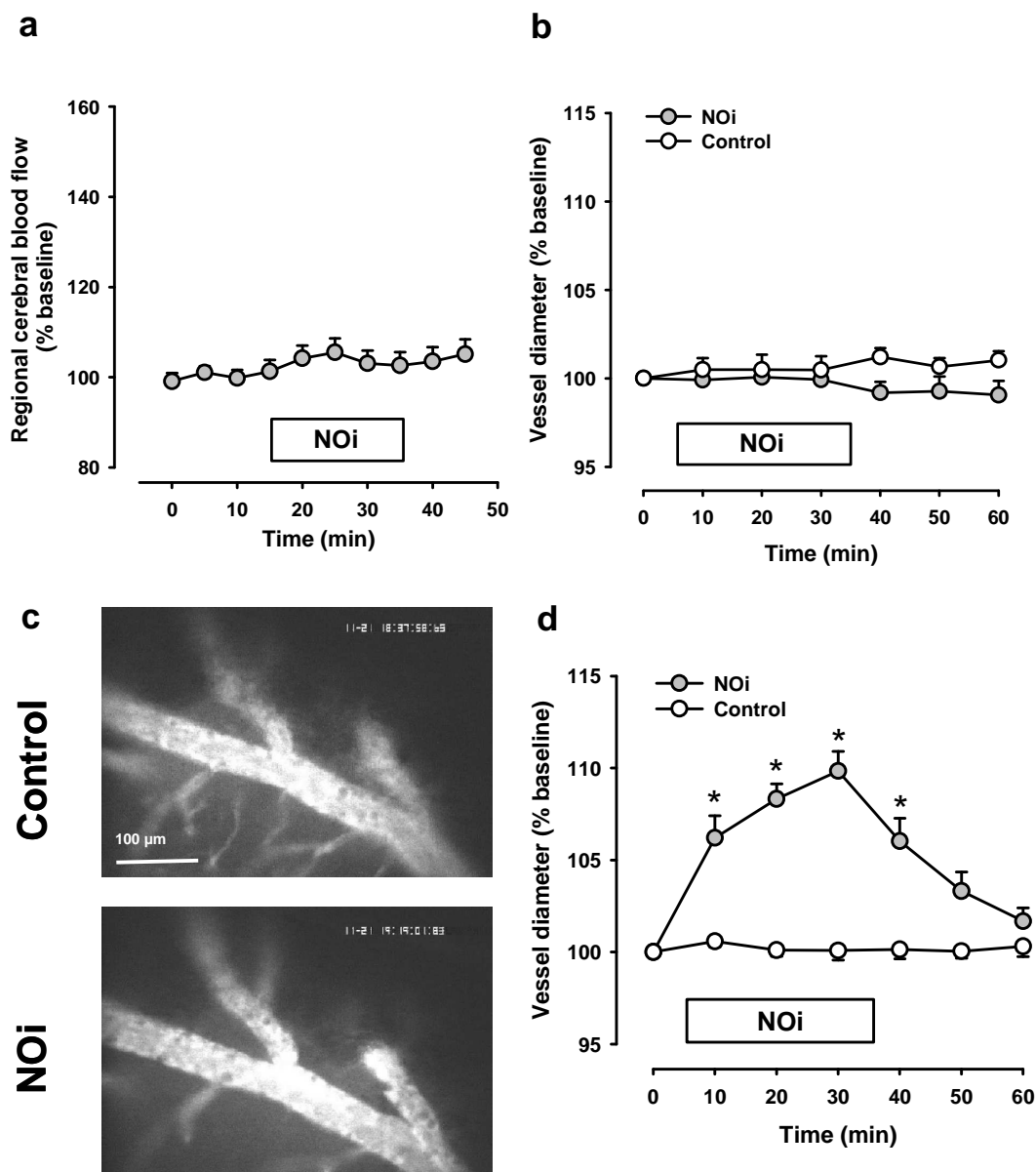


Abb. 5: Zerebrovaskuläre Effekte der NO - Inhalation im Maus-Modell aus Terpolilli et. al.: *Inhalation of Nitric Oxide reduces ischemic brain damage by selective increase of collateral blood flow: "Robin Hood Effect"*, Manuskript in Review.

Um zu überprüfen, ob es sich hierbei um einen spezifischen NO – Effekt handelt, wurde im gleichen Versuchsaufbau der Fluoreszenz - Farbstoff 4,5 - Diaminofluorescein (DAF) injiziert, mit dem NO detektiert werden kann. In Abbildung 6 wird deutlich, dass die Fluoreszenz in der Vene deutlich zunimmt, eine Quantifizierung der Daten zeigte eine signifikante Zunahme der NO - bedingten Fluoreszenz.

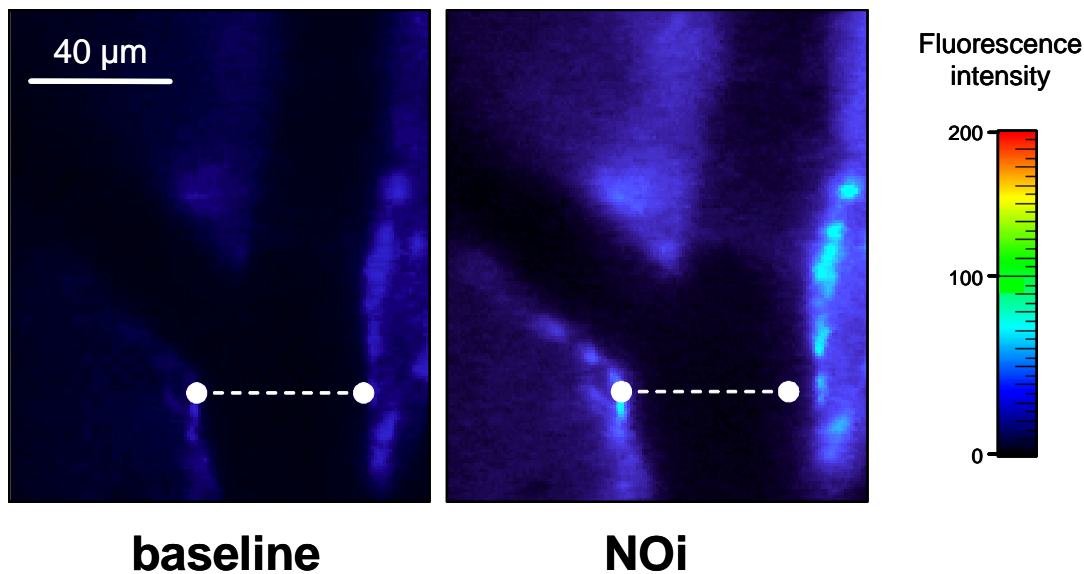


Abbildung 6: DAF - Fluoreszenz unter NO – Inhalation, aus Terpolilli et. al.: *Inhalation of Nitric Oxide reduces ischemic brain damage by selective increase of collateral blood flow: "Robin Hood Effect"*, Manuskript in Review.

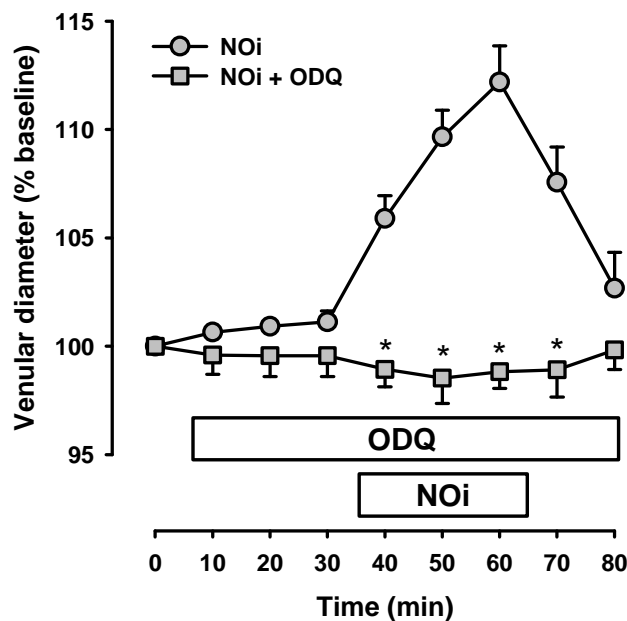


Abb. 7: Aufhebung des zerebrovaskulären NOi - Effekts durch den Guanylat – Zyklase - Inhibitor ODQ, aus: Terpolilli et. al.: *Inhalation of Nitric Oxide reduces ischemic brain damage by selective increase of collateral blood flow: "Robin Hood Effect"*, Manuskript in Review.

Verabreichung des selektiven Guanylat - Cyclase - Inhibitors 1[H - 1,2,4]Oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one (ODQ), der vor Beginn der iNO - Gabe direkt auf die beobachteten zerebralen Gefäße aufgebracht wurde, führte zu einer Aufhebung des oben beschriebenen Phänomens der Venodilatation (Abbildung 7).

Somit konnte nachgewiesen werden, dass inhaliertes Stickstoffmonoxid auf noch unbekannte Weise von der Lunge zum Gehirn transportiert wird, dort im venösen Kompartiment freigesetzt wird und zu einer Dilatation der Kapazitätsgefäße führt.

Ausgehend von diesen Befunden formulierten wir die Hypothese, dass inhaliertes NO in der zerebralen Zirkulation einem Bohr - ähnlichen Mechanismus folgend bevorzugt in Regionen mit niedrigem Sauerstoffpartialdruck ( $pO_2$ ), also unter physiologischen Bedingungen auf der venösen Seite des Gefäßsystems, freigesetzt wird (Abbildung 8). Unter hypoxämischen Bedingungen, wie sie beim Apoplex, aber auch beim Schädelhirntrauma vorliegen, herrscht bereits im arteriellen Stromgebiet ein niedriger  $pO_2$  vor. iNO sollte also in diesem Fall bereits bei den Arteriolen zu einer Weitung führen; da diese als Widerstandsgefäße für die Regulation der Durchblutung zuständig sind, sollte in diesem Fall eine Zunahme der zerebralen Durchblutung erfolgen.

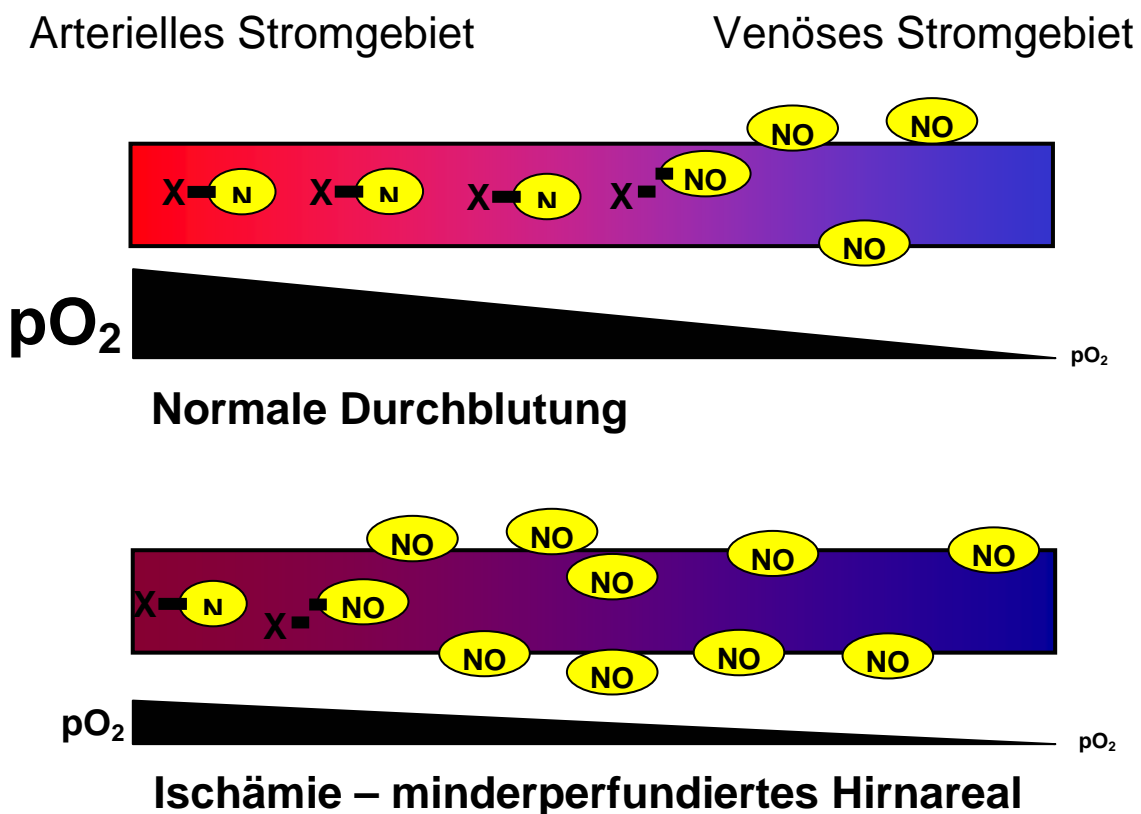


Abbildung 8: Hypothese zur Wirkung inhalierten Stickstoffmonoxids

Zur Überprüfung dieser Hypothese wurden die intravitalmikroskopischen Experimente unter globaler zerebraler Oligämie wiederholt; dafür wurden unter beidseitiger Kontrolle der zerebralen Durchblutung (mit Laser - Doppler - Fluxmetrie) beide Carotiden des Versuchstiers mit einem Faden umschlungen und partiell ligiert, sodass nur noch 40% der ursprünglichen Durchblutung vorherrschten; dieser Wert wurde durch Nachregulation des Fadens über den gesamten Beobachtungszeitraum beibehalten.

Wie man in Abbildung 9a sehen kann, kam es unter diesen Bedingungen wieder zu der bereits bekannten Venodilatation. Es kam jedoch auch auf der arteriellen Seite (Abbildung 9b) zu einer signifikanten Gefäßdilataion. Die Potenzierung der iNO - Wirkung durch Hypoxie wird mittels DAF - Fluoreszenz visualisiert (9c: Originalbild, 9d: Quantifizierung der Fluoreszenz).

Mit der NO - Inhalation verfügt man also über eine Methode, selektiv in minderperfundierten Hirnarealen eine arterielle Vasodilatation und somit eine Durchblutungssteigerung herbeizuführen, ohne in gesunden (ausreichend durchbluteten) Gefäßen einen Effekt zu erzielen.

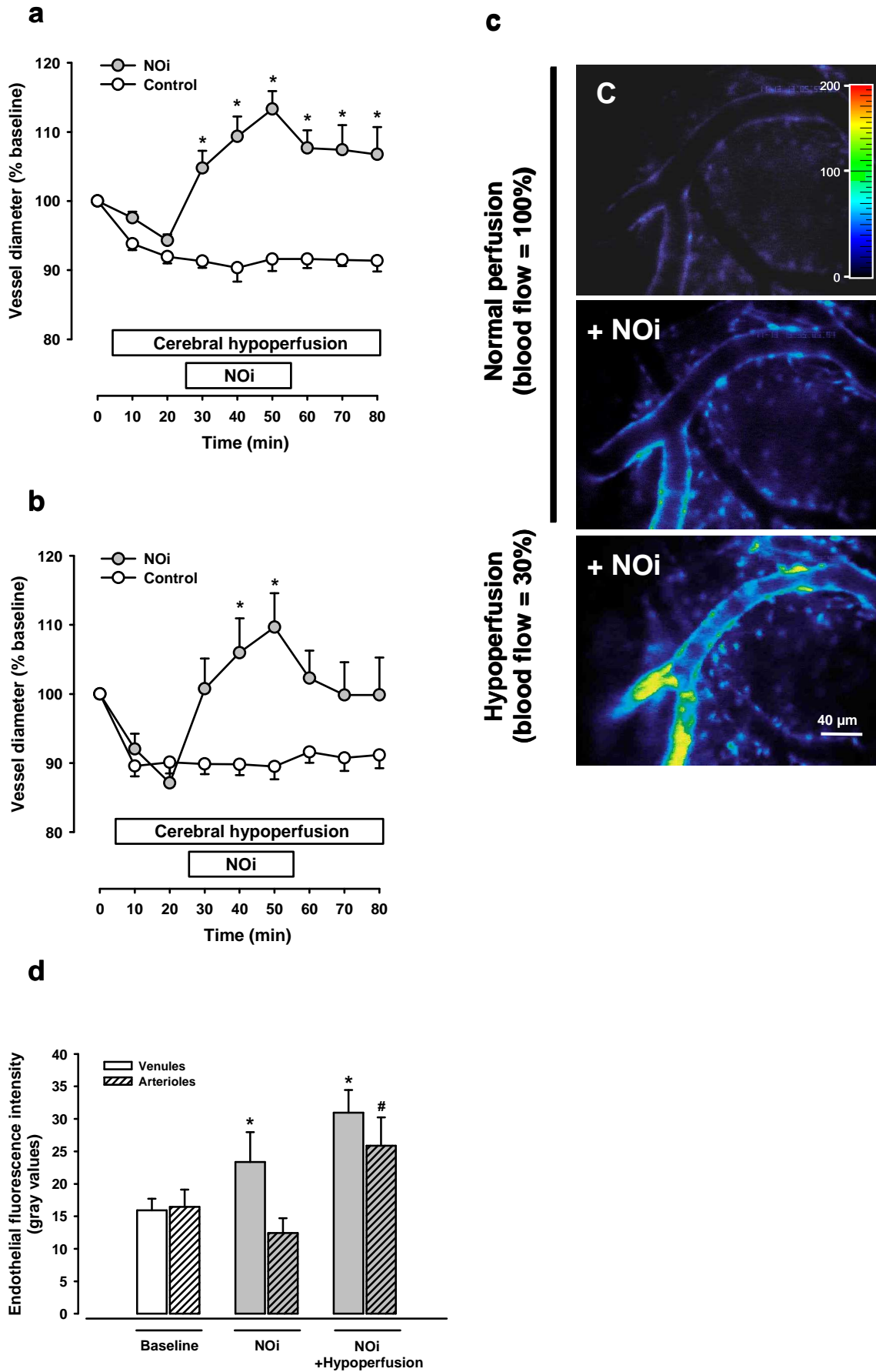


Abbildung 9. Zerebrovaskuläre Effekte der NO - Inhalation bei zerebraler Minderperfusion/ Ischämie, aus: Terpolilli et. al.: *Inhalation of Nitric Oxide reduces ischemic brain damage by selective increase of collateral blood flow: "Robin Hood Effect"*, Manuskript in Review.

### 1.2.3.5 NO - Inhalation als selektiver Vasodilatator in hypoxischen Hirnarealen

In diesem Zusammenhang muss man sich die regionalen Durchblutungsverhältnisse bei einer fokalen zerebralen Ischämie bewusst machen:

Im Zentrum des Infarkts gibt es einen Bereich, in dem die Durchblutung so stark abfällt, dass die dortigen Neuronen sofort absterben, die sogenannte „Core“ - Region. Um den Core herum befindet sich eine Zone mit vermindertem CBF, die sogenannte ischämische Penumbra.<sup>13, 135</sup> Die Zellen in diesem Gebiet zeigen zwar keine elektrische Aktivität mehr, sind jedoch strukturell noch mehr oder weniger intakt (Ionengradienten und Strukturstoffwechsel können unter ischämischen Bedingungen länger aufrechterhalten werden als die eigentlichen Zellfunktionen<sup>14</sup>). Wird die Durchblutung jedoch nicht wiederhergestellt, sterben die Neuronen in der Penumbra ab, der Infarkt - Core vergrößert sich.

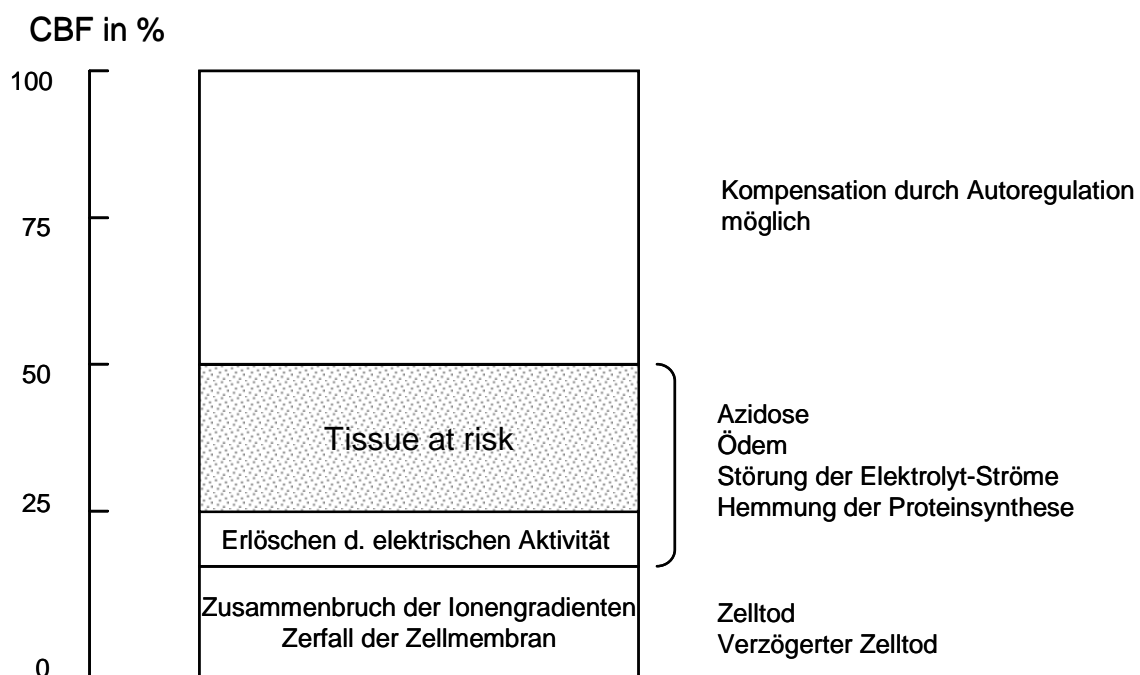


Abbildung 10: Pathophysiologische Folgen eines zerebralen Durchblutungsabfalls modifiziert nach Siesjö, BK: *Pathophysiology and treatment of focal ischemia*, Journal of Neurosurgery, 77, S. 169 – 184, 1992

Siesjö definiert die Penumbra allgemeiner als „that part of an infarct which is potentially salvagable“;<sup>325</sup> alle Gebiete, die weniger als 50% des Ausgangs - CBF erhalten, sind demnach zur Penumbra zählen (Abbildung 10). Mittels des von Connolly et al. beschriebenen Fadenokklusionsmodell der Maus<sup>57</sup> wurde eine fokale

zerebrale Ischämie induziert. Die NO - Inhalation wurde fünf Minuten nach Okklusion begonnen, woraufhin sich innerhalb von Minuten eine signifikante arterielle und venöse Vasodilatation nachweisen ließ (Abbildung 11a, b). Es kam bei den iNO - Tieren zu einer signifikanten Verbesserung der Durchblutung in der ischämischen Penumbra, während im Kerngebiet des Infarkts keine Veränderung nachweisbar war (11c). Die C<sub>14</sub>-Autoradiographie (11d) verdeutlicht dies: die Penumbra ist in iNO - Tieren deutlich besser perfundiert, zudem ist das überhaupt nicht durchblutete Core – Infarktreal hier kleiner. Darüber hinaus finden sich an der Konvexität der dargestellten Hemisphäre Zeichen für gesteigerte Kollateraldurchblutung (rote Pfeile). Die verbesserte Perfusion durch die NO - Inhalation führt zu einer deutlichen Verbesserung des postischämischen Metabolismus, was sich in der <sup>18</sup>Fluordesoxyglucose - Positronen - Tomographie (<sup>18</sup>FDG-PET) durch signifikant höhere Glukose-Aufnahme zeigt (11f Originalbild, 11g Quantifizierung des Glukose-Uptakes).

Insgesamt resultiert die NO - Inhalation in einem deutlich geringerem Infarktvolumen (Abbildung 12a: Histomorphometrie, 12b: Quantifizierung), wenn sie innerhalb einer Stunde nach MCA - Okklusion begonnen wird. Abbildung 12c macht deutlich, dass die Verringerung des Gesamt - Läsionsvolumens hauptsächlich in den rostral gelegenen Infarktabschnitten, der Lokalisation der Penumbra stattfindet.

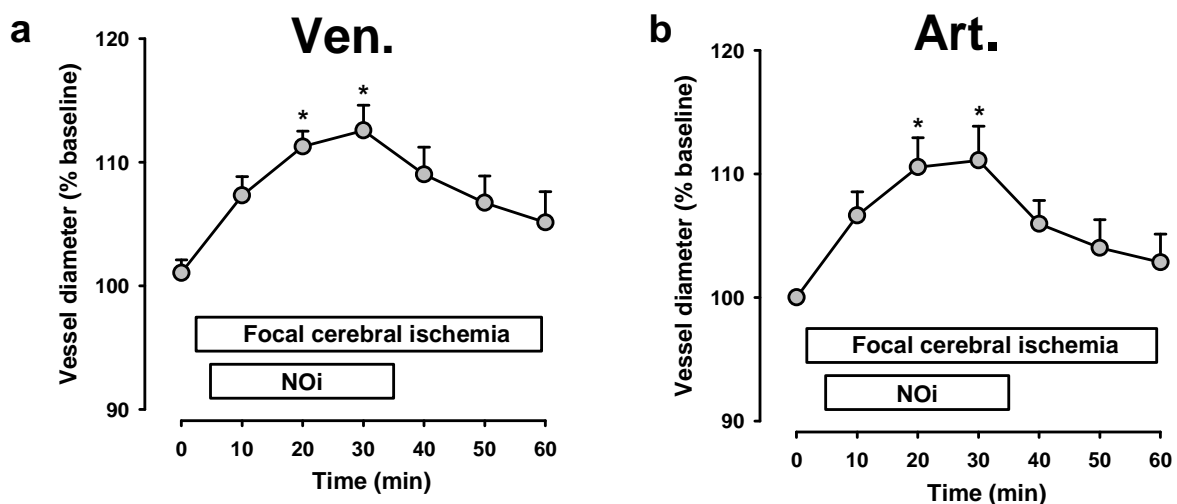


Abbildung 11 a, b. Effekt der NO – Inhalation auf zerebrale GefäÙe unter fokaler zerebraler Ischämie, aus: Terpolilli et. al.: *Inhalation of Nitric Oxide reduces ischemic brain damage by selective increase of collateral blood flow: "Robin Hood Effect"*, Manuskript in Review.

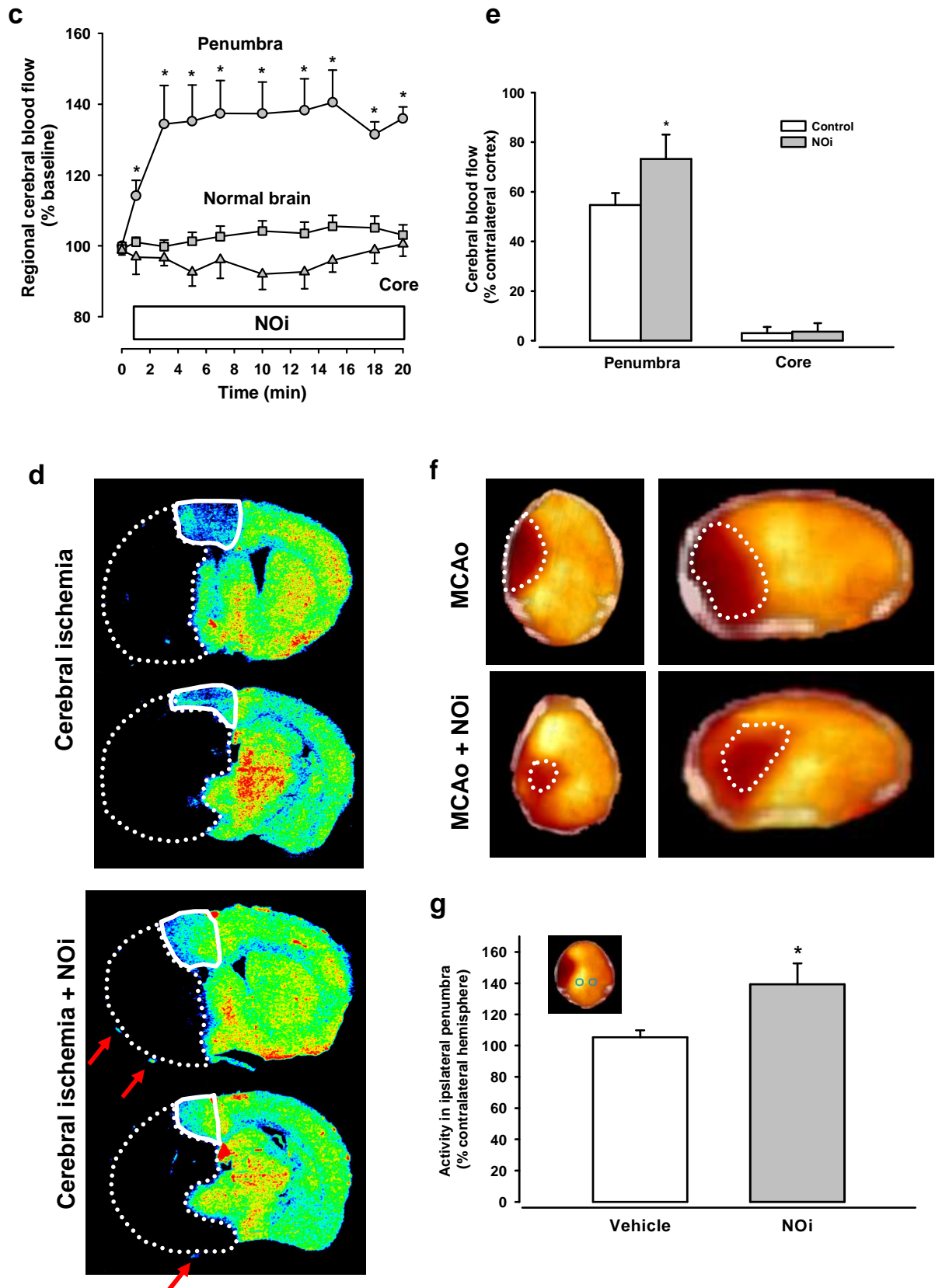


Abbildung 11. Auswirkungen der NO - Inhalation auf die pathophysiologischen Veränderungen nach fokaler zerebraler Ischämie, aus: Terpolilli et. al.: *Inhalation of Nitric Oxide reduces ischemic brain damage by selective increase of collateral blood flow: "Robin Hood Effect"*, Manuskript in Review.



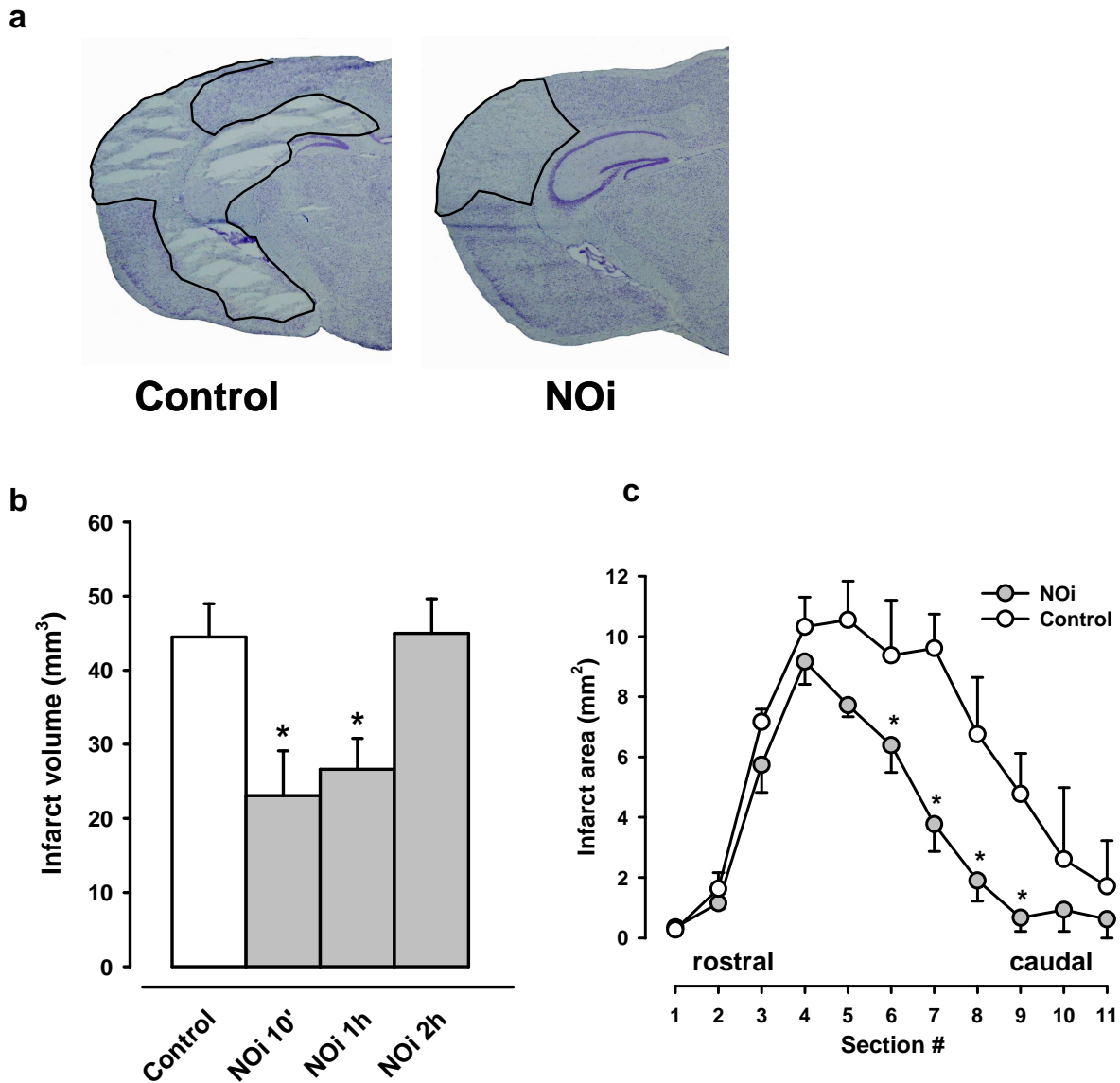


Abbildung 12: Auswirkungen der NO - Inhalation auf die Größe der Infarkts nach transienter fokaler zerebraler Ischämie. a. Coronare Hirnschnitte, die Infarktzone wurde markiert. b. Infarktvolume von Tieren, die 10 Minuten, 1 Stunde und 2 Stunden nach Beginn der Ischämie 12 Stunden lang NO - Inhalation erhalten haben. c. Räumliche Verteilung der Nekrose, aus: Terpolilli et. al.: *Inhalation of Nitric Oxide reduces ischemic brain damage by selective increase of collateral blood flow: "Robin Hood Effect"*, Manuskript in Review.

### 1.3 Ziel der vorliegenden Studie

Auch beim Trauma gibt es perilesional Regionen, in denen das Parenchym empfindlicher auf einen Abfall des CPP und auf metabolische Veränderungen reagiert als weiter von der Verletzung entfernt liegendes Gewebe. Diese Zone wird – im Anknüpfung an die ischämische Penumbra – als „traumatische Penumbra“<sup>244, 253</sup> bezeichnet. Wie bereits erwähnt ist ein wichtiger pathophysiologischer Mechanismus in dieser Zone die Ischämie. Eine selektive Verbesserung der Perfusion in diesem

Areal sollte sich positiv auf das sekundäre Nekrosewachstum nach Trauma auswirken.

In der vorliegenden Arbeit sollte deswegen untersucht werden, wie sich die NO - Inhalation auf die pathophysiologischen Vorgänge nach experimentellem Schädelhirntrauma auswirkt.

## **2 Material und Methoden**

### **2.1 Versuchstiere**

Für die Versuche verwendeten wir männliche C 57/Black 6 Mäuse mit einem Gewicht von 22 – 26 Gramm (Charles River, Kisslegg). Den Tieren wurde bei einem 12 Stunden Helligkeit - 12 Stunden Dunkelheit - Zyklus freier Zugang zu Nahrung und Trinkwasser gewährt.

Für die S - Nitroso - Hämoglobin - Bestimmung, die Bestimmung der Blutungszeit und die Nitrit- und Nitrat - Messungen wurden wegen des größeren Blutvolumens männliche Sprague - Dawley - Ratten zwischen 200 und 300 Gramm verwendet (Charles River, s.o.).

Alle beschriebenen Prozeduren sind im Einklang mit den Richtlinien der Regierung von Oberbayern über die Durchführung von Tierversuchen (AZ 88/ 04).

### **2.2 Narkose**

Zunächst wurden die Tiere 30 Sekunden lang in einer Halothankammer betäubt (4%, Halocarbon Laboratories, River Edge, NJ, USA, Vernebler: Halothane Vapor 19.3, Dräger, Lübeck). Die Narkose wurde dann mit einem Gemisch aus 1,2% Halothan, 30% Sauerstoff und 69% Lachgas, das über eine Gesichtsmaske appliziert wurde, aufrechterhalten.

Bei Experimenten mit einer Beobachtungsdauer von 90 min nach Trauma erhielten die Tiere eine intraperitoneale Injektion einer Kombination aus Medetomidin (0,5 mg/ kg Körpergewicht; Domitor®, Pfizer, Karlsruhe), Midazolam (5 mg/ kg KG, ratiopharm, Ulm) und Fentanyl (0,05 mg/kg b.w., Janssen - Cilag, Neuss). Nach einer Stunde wurde die Hälfte der angegebenen Dosis nachgespritzt.

Während der gesamten Versuchszeit wurde die Körpertemperatur der Versuchstiere mit einer Heizplatte (FHC, Bowdoinham, ME, USA) bei 37°C gehalten. Diese war über einen rektalen Temperaturfühler rückgekoppelt.

### **2.3 Chirurgische Präparation und Überwachung**

#### **2.3.1 Mechanische Ventilation**

Nach Einleitung der Anästhesie wurden die über 90 min beobachteten Tiere mit einem Mikrokatheter orotracheal intubiert und an ein Beatmungsgerät angeschlossen (Minivent 845, Hugo Sachs Elektronik, March - Hungstetten); Atemfrequenz und

Atemzugsvolumen wurden während des gesamten Versuchs mittels Mikrokapnometrie im expiratorischen Schenkel des Systems überprüft (Micro Capnograph CI240, Columbus Instruments, Columbus, OH, USA), um die Sauerstoff- und Kohlenstoffdioxidpartialdruckwerte im physiologischen Bereich zu halten. Aus Vorversuchen wussten wir, dass eine endexpiratorische CO<sub>2</sub>-Konzentration (end-tidal = etCO<sub>2</sub>) von 30 bis 42 mmHg einem physiologischen Kohlenstoffdioxidpartialdruck (35-45 mmHg) entspricht. Die angestrebten Zielwerte waren eine Atemfrequenz von 120 bis 160 pro Minute, ein Atemzugvolumen von 200 µl und ein Sauerstoffpartialdruck zwischen 70 und 100 mmHg. Zusätzlich wurde den Tieren vor Trauma und nach Ende des Beobachtungszeitraumes eine Blutprobe zur Blutgas- und Elektrolytanalyse entnommen. Die Blutgasanalyse wurde mit einem handelsüblichen Analysegerät (Nr. 860, Chiron Diagnostics Corporation, East Walpole, MA, USA) durchgeführt. Bei der maschinellen Beatmung wird völlig feuchtigkeitsfreies Atemgas verwendet. Da keine Möglichkeit besteht, die Atemluft anzufeuchten, wurde den Tieren über eine Pumpe kontinuierlich physiologische Kochsalzlösung (0,3 ml/ h) infundiert, um einer Dehydrierung entgegenzuwirken.

### **2.3.2 Messung des systolischen Blutdrucks**

Die Messung des mittleren arteriellen Blutdrucks erfolgte in der rechten Arteria femoralis der Versuchstiere; zu diesem Zweck wurde die Arterie freipräpariert und mit einem vorher heparinisierten Kunststoffkatheter (Innendurchmesser 0,28mm, Außendurchmesser 0,61mm; Portex, Hythe, England) kannuliert; der Katheter wurde anschließend mit einer Ligatur (Dicke 5/0, Pearsall Ltd, Taunton, England) und Gewebekleber (vetbond, 3TM Animal care products, St. Paul, MN, USA) fixiert.

Dieser mit physiologischer Kochsalzlösung gefüllte Katheter wurde dann an einen piezoelektronischen Druckaufnehmer (Gabarith PMSET 1DT-XX, Becton Dickinson, Sandy, , USA) angeschlossen; die Rohdaten wurden durch das Programm DasyLab (Version 5.02.20, Datalog GmbH, Mönchengladbach) gemittelt, aufgezeichnet und gespeichert. Die endgültige Auswertung erfolgte mit einer wissenschaftlichen Auswertungssoftware (FlexPro 6.0.25, Weisang GmbH & Co KG, Kassel).

### **2.3.3 Messung des intrakraniellen Drucks**

In Abbildung 13 wird die Position der Mikrosonde zur Messung des intrakraniellen Drucks verdeutlicht: rechts neben dem Bregma wird mit einem Bohrer eine kleine Kraniotomie angelegt, durch die der Druckmesskatheter (Mammendorfer Institut für Physik und Medizin, Mammendorf; Durchmesser 0,9 mm) eingeführt wird.

Die Messwerte, die intraparenchymatös erhoben werden, wurden über einen Transducer in einen Computer eingespeist; mit den Daten wurde auf dieselbe Weise wie bei der Bestimmung des MAP verfahren (s.o.). Zur Nullpunkt - Bestimmung wurde die Sonde zunächst in physiologischer Kochsalzlösung geeicht; die Ausgangswerte wurden vor Induktion des Traumas über fünf Minuten aufgezeichnet.

### **2.3.4 Messung der zerebralen Durchblutung**

Die zerebrale Durchblutung wurde in unserem Versuchsaufbau mit der Laser - Doppler - Fluxmetrie bestimmt. Zu diesem Zweck wurden an beiden Seiten des Mausschädels zwei Glasfaser - Sonden (MT B500-0, Perimed, Stockholm, Schweden) über dem Arteria cerebri media - Stromgebiet angebracht und mit einem Zweikomponentenkleber befestigt (Cyanoacrylate "Maxi - Cure", Plastruct, City of Industry, CA, USA; Härter: Accelerator "Insta - Set", City of Industry, CA, USA). Um eine bessere Messqualität und Haftung zu erreichen, wurden die Ansatzsehnen der Mm. temporales teilweise abgetrennt. Zur Messung wurden Laser - Doppler - Messsonden (Probe 418/1, Perimed, Stockholm, Schweden) an den Glasfaserkabeln befestigt und mit dem Laser - Doppler - Gerät (Periflux 4001 Master, Perimed, Stockholm, Schweden) verbunden. Die Durchblutungswerte werden als Prozent des Ausgangswertes angegeben; dieser Baseline - Wert wurde vor dem Trauma zehn Minuten lang aufgenommen.

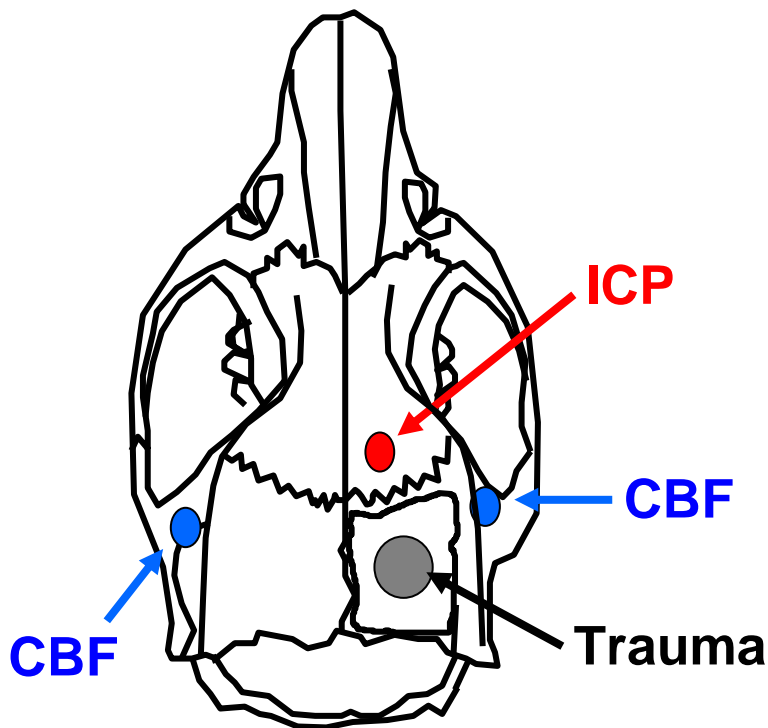


Abbildung 13. Lage der Messsonden für die zerebrale Durchblutung und den intrazerebralen Druck zum Trauma.

### 2.3.5 Trauma – Induktion

Als Traumamodell wurde das bereits mehrfach beschriebene Controlled Cortical Impact - Modell (CCI) der Maus verwendet, das bereits mehrfach in der Literatur<sup>137, 328, 395</sup> beschrieben wurde und eine verlässlich reproduzierbare Kontusion erzielt. Das Gerät zur CCI - Applikation (MouseKatjuscha 2000, L. Kopacz, Johannes - Gutenberg - Universität Mainz, siehe Abbildung 14) besitzt einen pressluftgetriebenen Stempel, 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 (Abbildung 15).

Für die Versuche wurde zunächst mit einem Präzisionsbohrer (Rewatronic Products, Wald - Michelbach; Bohrkopf GD890R, Durchmesser 0,6mm, Aesculap, Tuttlingen) rechts parietal eine Kraniotomie angelegt ohne dabei die Dura mater zu verletzen (Abbildung 13). Um Hitzeentwicklung zu vermeiden, wurde während des Bohrens kontinuierlich mit 0,9% iger Kochsalzlösung gespült. Dabei wurde die Knochenplatte

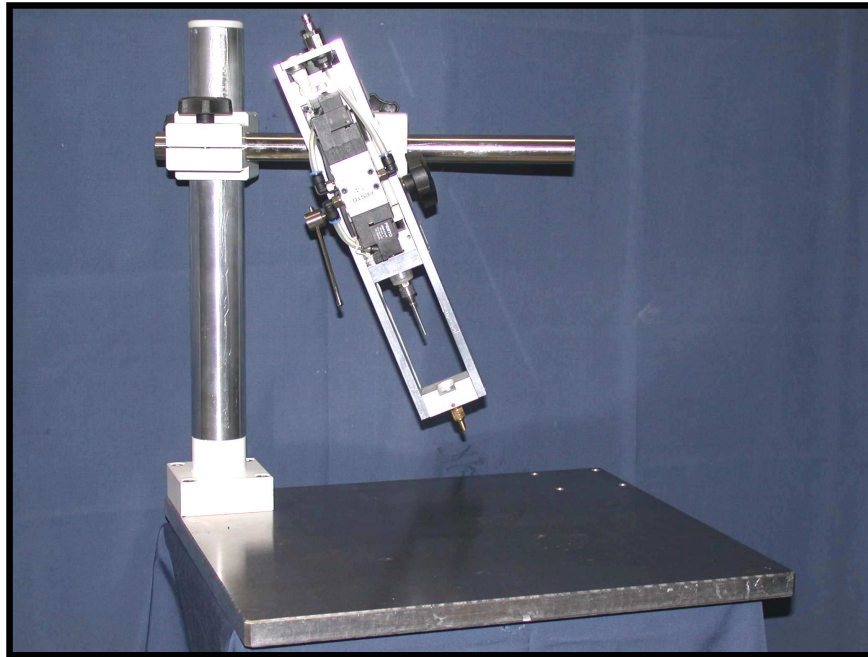


Abbildung 14. Trauma - Applikator für das Controlled Cortical Impact Modell

an der Medianlinie belassen und zunächst zur Mitte hin hochgeklappt. Der gesamte Operationstisch wurde dann mit dem Versuchstier in definierter Stellung unter der CCI – Maschine platziert, bei welcher vor jedem Versuch die Eindringtiefe 1mm, die Geschwindigkeit 8 m/s und die Kontaktzeit von 150 ms eingestellt wurde. Die Geräte zur intrakraniellen Druck - und zur Durchblutungsmessung mussten für diesen Zeitraum (ca. 3 min) abgenommen werden, weswegen die erste Messung nach Trauma zum Zeitpunkt  $t= 3 \text{ min}$  erfolgte.

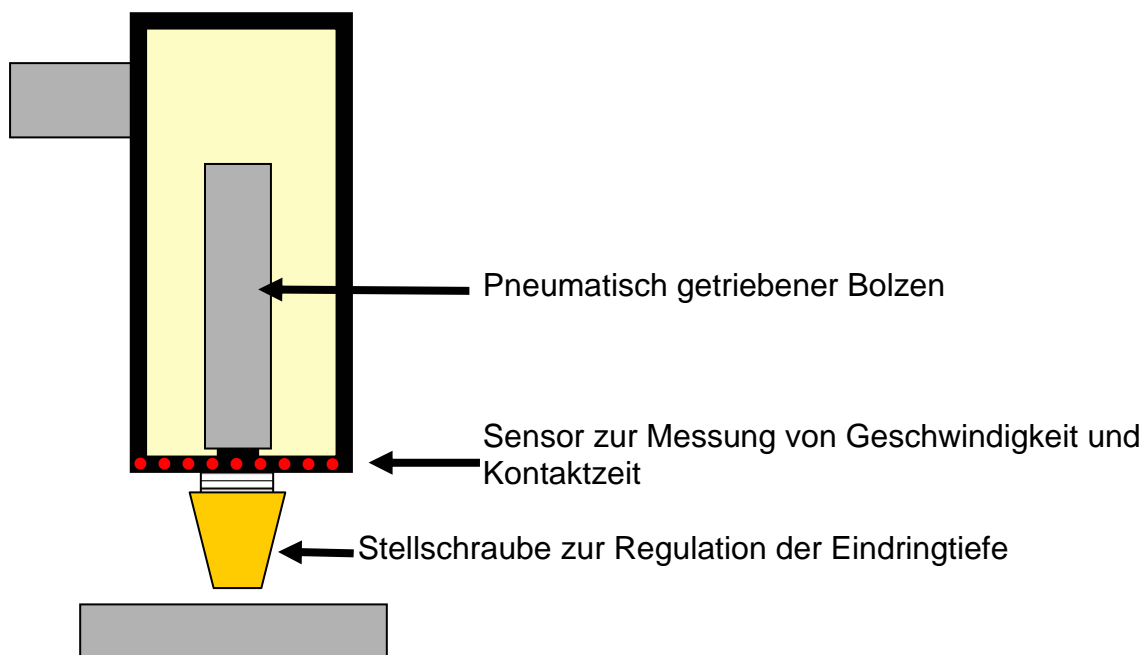


Abbildung 15: Schematische Darstellung des Trauma - Applikators

Nach Auslösung des Traumas wurde die Kraniotomie mit Gewebekleber (vetbond, 3TM Animal care products, St. Paul, MN, USA) verschlossen.

Bei einer 90 - minütigen Beobachtungsdauer wurden daraufhin ICP - und Laser - Doppler - Sonden schnellstmöglich wieder angeschlossen.

Bei Tieren in längerfristigen Versuchen wurde die Hautwunde sorgfältig verschlossen (Ethibond Excel 5/0, Ethicon, Brüssel, Belgien).

### 2.3.6 NO - Inhalation

Für die Durchführung der Stickstoffmonoxid - Inhalation stand uns das Gas in einer Konzentration von  $264 \text{ mg/m}^3$  in  $\text{N}_2$  zur Verfügung (Linde Ag, Unterschleißheim). Zur Durchführung von Versuchen, bei denen die Tiere an ein Ventilationsgerät angeschlossen waren, leiteten wir das Gas in den inspiratorischen Schenkel des Beatmungsgerät ein und mischten es einem Sauerstoff / Luft - Gemisch (30%  $\text{O}_2$ , 70% Luft) in dem Maße zu, dass eine Konzentration von 50 ppm NO erreicht wurde. Diesen Wert kontrollierten wir vor Beginn des Versuchs mit einem elektrochemischen NO - Sensor (ITX, industrial scientific corporation, Oakdale, PA, USA). Zusätzlich wurde die Sauerstoffkonzentration kontinuierlich vor und nach der NO - Zuleitung überprüft (Oxydig, Drägerwerke AG, Lübeck).

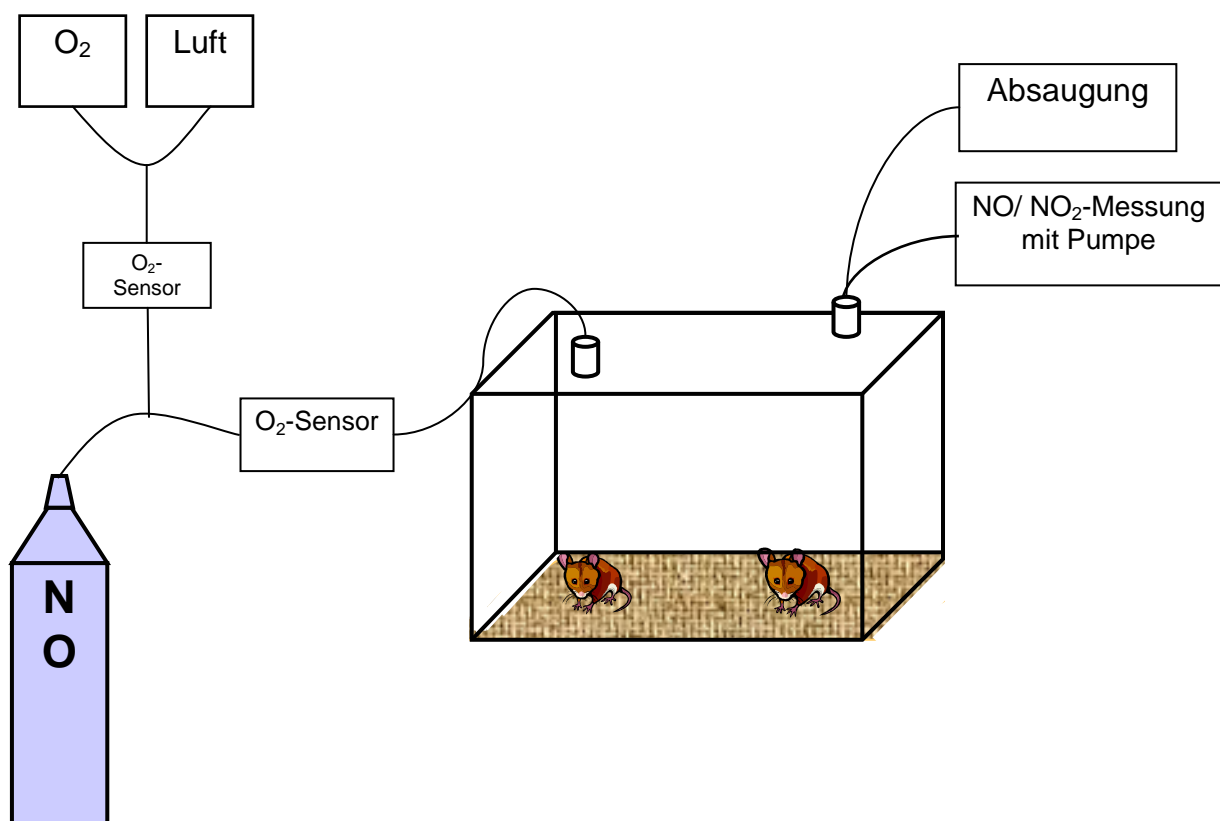


Abbildung 16: Versuchsaufbau zur Durchführung der Langzeit - NO - Inhalation



Versuche, die eine längere Inhalationsdauer erforderten, führten wir in einem speziell dafür angefertigten Glasbehälter durch (Abbildung 16). Für ein Aquarium (240 x 300 x 220 mm, VWR international, Darmstadt) wurde zunächst ein gasdicht schließender Deckel mit zwei kleinen Öffnungen maßgenau angefertigt. Diese ermöglichten eine kontrollierte Gasein- und Ausleitung. Das NO wurde dem Sauerstoff/ Luft - Gemisch (30% O<sub>2</sub>, 70% Luft) kurz vor dem Einleiten zugemischt, damit das NO nur mit einem möglichst kurzen Schlauchstück in Berührung kam. Vor und nach der Stickstoffmonoxid - Zugabe wurde die Sauerstoffkonzentration bestimmt, damit die NO - Dosierung stets bei 50 ppm gehalten wurde. Die im Versuchsbehältnis herrschende NO<sub>2</sub> - Konzentration wurde ebenfalls mit einem elektrochemischen Sensor (ITX, s.o.) am Gas - Auslass überwacht; sie war während aller Versuche immer unter 1 ppm.

### **2.3.7 Experimentelle Gruppen**

In einer ersten Studie untersuchten wir den kurzfristigen Einfluss der NO - Inhalation auf ICP, rCBF und MAP. Die iNO - Gruppe (n=8) erhielt 10 bis 90 Minuten nach Trauma 50 ppm NO zusätzlich zum normalen Beatmungsgas (s.o.), mit dem die Kontrollgruppe (n=8) über den gesamten Beobachtungszeitraum beatmet wurde.

Eine zweite Studie hatte das Ziel, die längerfristigen Wirkungen der NO - Inhalation auf sekundäre pathophysiologische Prozesse nach Schädelhirntrauma aufzuzeigen. Zu diesem Zweck wurde das Nekrosevolumen 24h nach Trauma bestimmt. Um sicherzustellen, dass die Ausgangsläsion in allen Versuchsgruppen vergleichbar ist, wurde bei allen Experimenten zusätzlich zur eigentlichen Kontrolle eine 15 - min - Kontrollgruppe durchgeführt, um den Primärschaden zu quantifizieren.

Zudem sollte bestimmt werden, ob es ein therapeutisches Fenster für eine mögliche iNO - Therapie gibt, weswegen verschiedene Therapiedauern untersucht wurden.

Eine erste Gruppe (n=8) erhielt 10 Minuten nach Trauma für insgesamt 24h iNO; bei weiteren Tieren (je n=8) begannen wir 1, 2 und 3 Stunden nach Trauma mit der Inhalation, die wiederum bis zum Zeitpunkt 24h nach Trauma fortgeführt wurde. Kontrollen wurden 10 min nach Trauma - wie oben beschrieben - in einem gleichartigen Behältnis unter 30% O<sub>2</sub> und 70% Luft gehalten.

In einer zweiten Versuchsreihe wurde die Dauer der iNO - Anwendung variiert: 10 Minuten nach Trauma erhielten die Tiere 50 ppm NO für 12 bzw. 18h zusätzlich zum normalem Atemgas (s.o.).

Eine dritte Studie untersuchte die Frage, ob das Phänomen der Tachyphylaxie, eine Wirkungsabschwächung bei Dauergabe, die die systemische Therapie mit Nitraten erschwert, auch bei der NO - Inhalation eine Rolle spielt.

Zu diesem Zweck wurde die NO - Beimischung zur Atemluft diskontinuierlich durchgeführt; immer nach 3h iNO wurde eine Stunde pausiert (n=7).

Eine mögliche Auswirkung inhalierten Stickstoffmonoxids auf die Ausbildung des posttraumatischen Hirnödems untersuchten wir an Tieren, die 10 Minuten bis 24 Stunden nach Trauma mit 50 ppm NO beatmet wurden und an einer 24h Kontrollgruppe (je n=8).

In separaten Studien untersuchten wir den Wirkmechanismus der NO - Inhalation. Wir führten eine Bestimmung von Nitrosyl - Hämoglobin im Blut durch, außerdem wurden die Nitrit - und Nitrat - Konzentration gemessen sowie eine Bestimmung von S - Nitroso - Hämoglobin durchgeführt. Dazu beatmeten wir Mäuse (n=5) 30 Minuten mit 50 ppm NO und entnahmen eine arterielle Blutprobe aus der A. carotis communis. Da das geringe Blutvolumen der Maus nur eine valide Blutentnahme zuließ, führten wir auch eine NO - Hb - Bestimmung bei männlichen Sprague - Dawley - Ratten (n=5) durch. Diesen entnahmen wir drei arterielle (A. carotis communis) und venöse (V. iugularis interna) Blutproben: einen Baseline - Wert unter maschineller Beatmung, eine Probe nach 30 minütiger NO - Inhalation und einen post - iNO - Wert 30 Minuten nach Ende der NO - Beimischung.

Die Nitrit - und Nitratmessung erfolgte aus oben genannten Gründen ebenfalls zusätzlich im Blut von SD - Ratten. Arterielle und venöse Blutproben wurden – wie eben beschrieben – vor, unter und 30 min nach iNO entnommen.

Die Blutungszeit am Schwanz wurde in derselben experimentellen Gruppe zunächst unter Normalbedingungen, 15 Minuten nach Beginn der NO - Inhalation und 15 min nach Ende von iNO bestimmt.

### **2.3.8 Körpergewicht**

Das Körpergewicht der Tiere in 24 Stunden dauernden Versuchen wurde vor Beginn des Experiments und nach 24 Stunden bestimmt (Mettler Toledo, Giessen).

## **2.3.9 Histologische Auswertung des Nekrosevolumens**

### **2.3.9.1 Herstellung der Präparate**

Nach 24 Stunden wurden die Tiere in tiefer Halothannarkose durch zervikale Dislokation getötet; sofort im Anschluss daran wurden die Gehirne sorgfältig entnommen und in Trockeneispulver eingefroren. Bis zur weiteren Verarbeitung wurden sie bei -20 °C gelagert.

Da sich für die Bestimmung des Nekrosevolumens Gefrierschnitte bewährt haben, wurden die Gehirne zunächst eingebettet (Tissue - Tek®, Sakura Finetek Europe, Zoeterwoude, NL), daraufhin wurden mit einem Kryostaten (Cryostar MH 560, Microm, Walldorf) jeweils 14 Gefrierschnitte (10 µm Dicke) in einem Abstand von 500 µm angefertigt, wobei der erste 1000 µm distal des Bulbus oculi angesetzt wurde.

Die so gewonnenen Schnitte wurden nach Nissl<sup>270</sup> zehn Minuten in Kresylviolett gefärbt, fixiert und eingedeckelt (Eukitt®, O. Kindler GmbH & Co, Freiburg).

### **2.3.9.2 Auswertung durch Histomorphometrie**

Die histologische Auswertung der Serienschnitte erfolgte mit einem Mikroskop (Olympus BX 41, Olympus, Hamburg). Mit einer an eine Bildwandlerkarte angeschlossenen Kamera (Olympus Camedia C5050, Olympus, Hamburg) wurde dann jeder Schnitt bei 12,5 facher Vergrößerung fotografiert; ein Beispiel für ein solches digitales Bild zeigt Abbildung 17. Anhand dessen wurde mittels einer Auswertungssoftware (Olympus DP-Soft, analySIS, Version 3.2., Olympus, Hamburg) die Größe beider Hemisphären und der Kontusion bestimmt. Anschließend wurde das Nekrosevolumen mit einem Rechenprogramm nach folgender Formel berechnet:  
 $A_1 \times 0,5 + A_2 \times 0,5 \dots \dots \dots + A_{14} \times 0,5.$

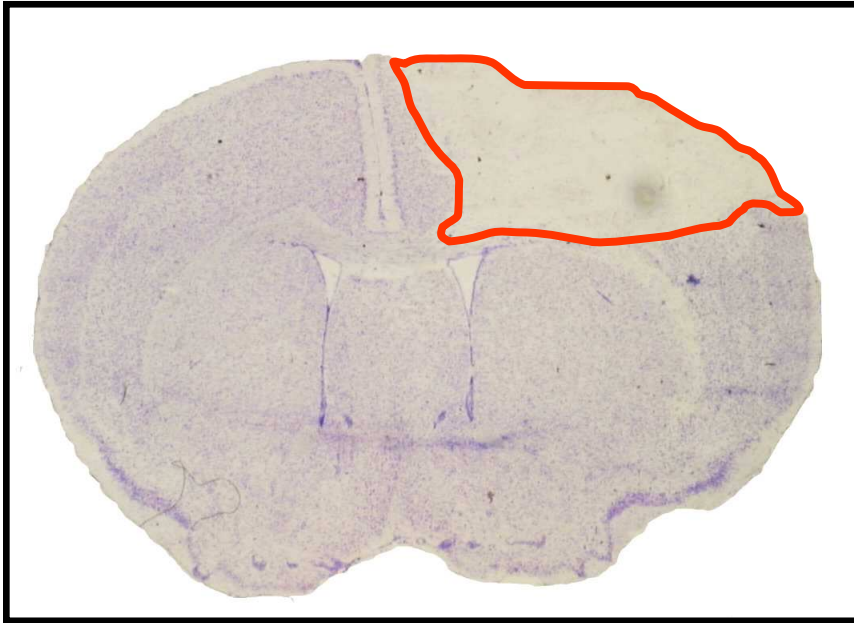


Abbildung 17: Nissl - gefärbter koronarer Hirnschnitt der Maus. Das nekrotische Gebiet wird für jeden Schnitt markiert und seine Fläche bestimmt

### **2.3.10 Bestimmung des Hirn - Wassergehalts**

Durch Bestimmung des Hirn - Wasser - Gehalts lässt sich die Flüssigkeitszunahme, also die Ödemformation nach Trauma, messen. Dafür wurde das Gehirn wie für die Histologie entnommen und in eine Petrischale mit gekühlter physiologischer Kochsalzlösung gelegt. Unter Zuhilfenahme eines Spiegels, auf den das Gefäß gestellt wurde, wurden darauf zunächst vorsichtig mit einer Rasierklinge der Bulbus oculi und das Kleinhirn entfernt, dann die Hemisphären an der Mittellinie getrennt. Die Gehirnhälften wurden dann in separate Glasbehälter (Wägegglas 35 x 30mm, Schott AG, Jena), deren Leergewicht vorher bestimmt worden war, gelegt und deren Feuchtgewicht gemessen (Mettler Toledo, Giessen). Um das Trockengewicht zu bestimmen, wurden die Hemisphären 24 Stunden lang in einem Trockenschrank (Memmert, Schwabach) bei 100°C gelagert und erneut gewogen. Der Wassergehalt ergibt sich als Differenz aus beiden Werten und wird in Prozent des Ausgangsgewichts angegeben.

### **2.3.11 Bestimmung von Eisen - Nitrosyl - Hämoglobin**

Wie in 2.3.7. beschrieben entnehmen wir C57/bl6 - Mäusen bzw. Sprague - Dawley - Ratten mit einer 26G Nadel und einer 1 ml Spritze jeweils 0,7 ml

arterielles (A.carotis communis) bzw. 0,7 ml arterielles und venöses (V. iugularis) Blut. Die Proben wurden sofort mit flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur Analyse bei -80 Grad Celsius aufbewahrt.

Die Bestimmung des Nitrosyl - Hämoglobins erfolgte durch Dr. B. Fink (Noxygen Science Transfer & Diagnostics GmbH, Elzach) nach der von ihm publizierten Methode<sup>69</sup> mittels der Elektronen - Spin - Resonanz - Spektrometrie (ESR-Spektrometrie), da dies die genaueste Methode zur Bestimmung von Nitrosyl - Hämoglobin ist.

Stickstoffmoleküle besitzen wie andere Ionen und Radikale ein ungepaartes Elektron; dies besitzt eine Eigenbewegung, die mit einem kleinen magnetischen Moment verbunden ist. Wird das Molekül einem äußeren Magnetfeld ausgesetzt, richtet es sich wie ein Stabmagnet parallel zu diesem aus und hat dadurch eine geringfügig höhere Energie. Bestrahlt man nun das Ion mit Mikrowellen, deren Energie genau dieser Energiedifferenz entspricht, regt man den Spin an<sup>15</sup>. Dabei wird Energie frei, die mit einem ESR - Spektrometer detektiert werden kann. Daraus ergeben sich für die verschiedenen Blutkomponenten charakteristische Spektren, anhand derer man die einzelnen Substanzen quantifizieren kann. Das ESR-Spektrum von Mausblut wird hauptsächlich von Coeruloplasmin, freien Radikalen und HbNO gebildet. Der HbNO - Gehalt ergibt sich dann nach Subtraktion der beiden anderen Spektren.

### **2.3.12 Bestimmung der Blutungszeit**

Die Blutungszeit wurde nach der von Dejana publizierten Methode, einer Adaption der 1969 erstmals von Mielke beschriebenen „Ivy - Nelson - Methode“<sup>255</sup>, bestimmt.<sup>67</sup> Narkotisierte männliche Sprague - Dawley - Ratten mit einem Gewicht zwischen 250 und 350 Gramm wurden intubiert und kontrolliert beatmet. An der dorsalen Seite des Schwanzes machten wir abseits der großen Gefäße eine 9 mm lange und 1 mm tiefe Inzision. Der Schwanz wurde dann senkrecht in einen mit 37 °C warmer physiologischer Kochsalzlösung gefüllten Glaskolben gehalten. Die Zeit bis zur Sistierung der Blutung wurde manuell gestoppt.

### **2.3.13 Messung von Nitrit und Nitrat im Plasma**

Die Nitrit - und Nitratbestimmung erfolgte im Blut von männlichen SD -Ratten. Die Proben wurden zunächst 5 Minuten bei 3000 g zentrifugiert (Labofuge 400R, W.C.

Heraeus GmbH, Hanau). Da Proteine, vor allem Hämoglobin, die Messung beeinträchtigen, zentrifugierten wir danach 25 Minuten lang zur Proteinentfernung durch einen Zentrifugationsfilter mit einer Porengröße von 30.000 kD (Ultrafree - MC Centrifugal Filter Units, Milipore Corporation, Bedford, MA, USA) bei 5000g.

Die Bestimmung der NO - Endprodukte Nitrit und Nitrat erfolgte mittels einer Fluoreszenz. Dazu verwendeten wir einen Kit der Firma Cayman Chemicals (Kit Nr. 78000, Cayman Chemicals Europe, Talinn, Estland).

Zunächst wird das in der Probe enthaltene Nitrat ( $\text{NO}_3^-$ ) durch die Zugabe von Nitrat - Reduktase in Nitrit ( $\text{NO}_2^-$ ) umgewandelt. Durch die Zugabe von 2,3 - Diaminophthalen (DAN) wird das so entstandene Nitrit in die fluoreszierende Verbindung 1(H) - Naphtotriazol umgewandelt.

Bei einer Exzitationswellenlänge von 360 nm und einer Emissionswellenlänge von 410 nm wurde mit einem Fluorometer (FLUOstar 403, BMG Lab Technologies GmbH, Offenburg) der Nitrit - Gehalt der einzelnen Proben bestimmt.

In der Diskussion mit führenden Experten in der Messung von Nitroso - Addukten im Blut wurde uns geraten, die Messungen mit einer genaueren Methode, der Chemiluminiszenz, zu wiederholen, da die fluorometrische Messmethode als ungenau erachtet wird und mit vielen Fehlerquellen behaftet sein kann, vor allem, weil Nitrit im Blut extrem instabil ist. Deswegen müssen die Nitroso - Addukte im Blut vor der eigentlichen Messung stabilisiert werden. Zu diesem Zweck wurden drei Stabilisierungslösungen entwickelt, deren Zusammensetzung und Funktion in Tabelle 2 beschrieben ist (alle dafür verwendeten Chemikalien wurden von Sigma – Aldrich Laborchemikalien, Seelze, erworben).

Die Blutproben (je 900  $\mu\text{l}$ ) wurden zunächst antikoaguliert (mit 100  $\mu\text{l}$  Stabilisierungslösung #1; Verhältnis 9:1). Nach 30 - sekündigem Durchmischen wurden die Proben 90 Sekunden lang bei 4.000 g zentrifugiert; 400  $\mu\text{l}$  des so gewonnenen Plasmas wurden daraufhin im Verhältnis 1:1 (je 400  $\mu\text{l}$ ) mit Stabilisierungslösung #2 30 Sekunden lang vermischt, sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur Messung bei  $-80^\circ\text{C}$  aufbewahrt. Die Messungen wurden mittels der ozon( $\text{O}_3$ )basierten Chemiluminiszenz<sup>235</sup> mit einem NO Chemiluminiszenz - Analyse - Gerät (NOA, NO - Analyzer, ANTEK Instruments, Houston, TX, USA) durchgeführt. Diese Mess - Methode basiert auf der (sehr schnellen) Reaktion von (gasförmigem) NO mit Ozon ( $\text{O}_3$ ); dabei entsteht  $\text{NO}_2^*$ , also Nitrit mit einem angeregten Elektron. Kehrt dieses in den Grundzustand zurück, wird ein Photon emittiert, das als Chemiluminiszenz detektiert werden kann ( $h\nu$ ). Dieses

Lichtsignal wird von einem Photomultiplier aufgefangen und amplifiziert; das so entstandene elektrische Signal wird aufgezeichnet. Anhand einer mit Proben bekannter  $\text{NO}_2^-$ -Konzentration erstellten Eichkurve kann dann die Nitrit - Konzentration der Probe bestimmt werden.

Um Nitrit mit der eben beschriebenen Methode zu messen, muss dies zunächst zu NO reduziert werden. Dazu wurde die Trijodid ( $\text{I}_3^-$ ) - Reduktions - Methode<sup>60, 82, 118, 235, 293</sup> verwendet. Nach Auftauen der Proben wurden diese in einem mit Helium durchströmten Reaktionsgefäß mit einer jodidhaltigen Reduktionslösung (2,0 g Kaliumiodid [KI], 1,3 g Iodid [ $\text{I}_2$ ], 40 ml Aqua dest., 140 ml Eisessig [ $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{H}$ ] ) inkubiert; dadurch reagierte das vorhandene Nitrit zu gasförmigem NO, welches dann vom angeschlossenen Analyse - Gerät erkannt wird. Da Trijodid auch andere NO - haltige Spezies reduzieren kann (u. a. N - Nitrosamine, S - Nitrosothiole, Eisen - Nitrosyle), wurde die Spezifität der Messung überprüft, indem jede Probe ein weiteres Mal analysiert wurde; zuvor wurde sie mit angesäuertem Sulfanilamid ( $\text{H}_2\text{NC}_6\text{H}_4\text{SO}_2\text{NH}_2$ , 5% in 1M HCl) vorbehandelt, das Nitrit in das durch Chemilumineszenz nicht nachweisbare Diazonium - Kation umwandelt. Durch Vergleich beider Werte kann die Nitrit - Konzentration bestimmt werden.

Außerdem wurden die Stabilisierungslösungen (genau im Mischverhältnis wie in den Proben) auf ihren Nitritgehalt untersucht; dieser Wert wurde als Leerwert von den gemessenen Werten abgezogen.

### Stabilisierungslösung #1 zur Antikoagulation

37.5% Natriumzitat (in PBS)	400uL
100mM NEM (in PBS)	500uL
10mM DTPA (in PBS)	100uL
Gesamt	1000uL

### Stabilisierungslösung #2 zur Konservierung von NO-Addukten im Plasma

100mM NEM in PBS	20uL
10mM DTPA (in PBS)	20uL
PBS	960uL
Gesamt	1000uL

### Stabilisierungslösung #3 zur Konservierung von NO-Addukten in Erythrozyten

$K_3Fe(CN)_6$ (0.95M in PBS)	31.5uL
100mM NEM in PBS	600uL
IGEPAL	30uL
10mM DTPA (in PBS)	30uL
PBS	1860uL
Gesamt	2550uL

- NEM: N-Ethylmaleimide ( $C_6H_7NO_2$ )  
zur Blockade freier Cystin-Reste in Proteinen, inaktiviert Endonukleasen
- DTPA: Diethylenetriaminepentaacetic acid ( $[(HOOCCH_2)_2NCH_2CH_2]_3NCH_2COOH$ )  
als Chelator von Kupfer und anderen in Spuren vorhandenen Metallen, die S-Nitrosothiole degradieren können
- IGEPAL:  $(C_2H_4O)_5C_{14}H_{22}O$   
zur Auflösung von Membranen, die das s-nitrosylierte Anion-Austauscher Protein 1 enthalten können

Tabelle 2: Stabilisierungslösungen für die Chemiluminiszenz - Bestimmung

### 2.3.14 Bestimmung von S - Nitroso - Hämoglobin

Die Konzentration von s -nitrosyliertem Hämoglobin wurde ebenfalls mit der Chemiluminiszenz - Technik bestimmt. Zu diesem Zweck wurden die Blutproben wie oben beschrieben vorbehandelt. Nach sorgfältiger Entfernung von Plasma und Buffy - Coat wurden 150 µl rote Blutzellen entnommen. Diese wurden mit Stabilisationslösung #3 im Verhältnis 1,5:8,5 30 Sekunden vermischt und ebenfalls in Flüssigstickstoff eingefroren. Die Messung erfolgte wie in 2.3.13 beschrieben mit der  $O_3$  - Chemiluminiszenz nach Trijodid - Reduktion. Wie bereits erwähnt reduziert  $I_3^-$  unterschiedliche Nitroso - Spezies. Da die Messung von S - NO - Hb komplex und sehr störanfällig ist, müssen die Proben so weit wie möglich von die Messung beeinträchtigendem Nitrit und Nitrosothiolen (RSNO) gereinigt werden. Zunächst wird



deswegen mit Sulfanilamid das enthaltende Nitrit in ein nicht durch die Chemilumineszenz detektierbaren Kation umgewandelt (s.o.); durch Messung einer so nitrit - bereinigten und einer nicht vorbehandelten Probe kann das durch Nitrit verursachte Signal ermittelt und abgezogen werden. Die RSNO werden auf ähnliche Weise durch Quecksilberchlorid ( $\text{HgCl}_2$ ) eliminiert. Nach Bestimmung des Hämatokrit kann die S - NO - Hb - Konzentration für Vollblut errechnet werden.

### **2.3.15 Protein - Nitrosylierung**

Proteinnitrosylierung wurde nach 24stündiger NO - Inhalation im Gehirn gesunder C57/BL6 Mäuse untersucht. Die Tiere wurden durch Fixationsperfusion mit 4% Paraformaldehyd (PFA) geopfert, die Gehirne entnommen und zunächst 24 Stunden in PFA, nach Wässerung in 70% Ethanol gelagert.

Nach Paraffin - Einbettung wurden alle 500  $\mu\text{m}$  4  $\mu\text{m}$  dicke koronare Schnitte angefertigt.

Diese wurden drei Stunden mit einem polyklonalen Kaninchen-Antikörper gegen Nitrotyrosin (upstate, Dundee, Großbritannien) inkubiert (Konzentration 1:50). Als sekundären Antikörper verwendeten wir biotinyliertes Maus - Anti-Kaninchen-IgG – Antikörper (DAKO, Hamburg), der daraufhin mit an Avidin gekoppelter alkalischer Phosphatase (AP) und dem dazugehörigen Chromogen (DAB) sichtbar gemacht wurde („Vectastain ABC Alkalische Phosphatase“ Methode, Vectastain AB AP Kit, über Alexis, Grunberg). Als Positivkontrolle dienten Schnitte, die zuvor mit Peroxynitrit ( $\text{ONOO}^-$ , Calbiochem, Merk Chemicals, Nottingham, Großbritannien) behandelt wurden. Die Spezifität des sekundären Antikörpers wurde durch Weglassen des primären Antikörpers überprüft; dabei zeigte sich keine Färbung.

### **2.3.16 Bestimmung der NO - Synthasen - Expression**

Gesunde C57/BL6 Mäuse wurden nach 24 - stündiger NO - Inhalation (oder Kontrolle) geopfert. Das Gehirn wurde unter sterilen Bedingungen entnommen, der Bulbus oculi sowie das Kleinhirn entfernt und die beiden Hemisphären sorgfältig getrennt.

Die RNA - Extraktion wurde sofort im Anschluss mit einem handelsüblichem Kit nach Anweisung durchgeführt (QIAGEN Lipid Tissue Mini Kit (50) , Qiagen, Hilden). Für die reverse Transkription wurden 5  $\mu\text{g}$  RNA ad 31,5  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$  zu 5 $\mu\text{l}$  10x PCR buffer

(Qiagen, Hilden) , 2,5 µl dNTP 10 mM, 2,5 µl DTT (0,4mM) and 2,5 µl Oligo DT (100 µM) hinzugefügt. Dieser Reaktionsmix wurde daraufhin fünf Minuten bei 65°C inkubiert, bevor 5 µl reverse Transkriptase (M-MLV Reverse Transcriptase RNase H Minus) und 1 µl Ribonuklease-Inhibitor (RNAsin, alle Reagenzien von Promega GmbH, Mannheim) zugegeben wurden. Die reverse Transkription wurde bei 95°C/30 s, 57°C/1min, 70°C/2min (30 Zyklen) durchgeführt; am Ende des Laufs wurde bei 95 °C fünf Minuten lang denaturiert. Die quantitative PCR wurde mit dem LightCycler® 2.0 System durchgeführt (Roche, Heidelberg). Für die Datenanalyse verwendeten wir die LightCycler® Software (Version 5.0, Roche). 1µl of cDNA wurde mit 2 µl LightCycler®-Faststart DNA Master SYBR Green I - Kit (Roche, Heidelberg, Germany), 6µl H<sub>2</sub>O und jeweils 0,5 µl des forward und des reverse Primers (Konzentration 5 µM) amplifiziert. Die Reaktion wurde durch 10 - minütiges Erhitzen auf 95°C gestartet. Die Amplifikation wurde in 40 Zyklen in folgenden Schritten durchgeführt: 15 Sekunden Denaturierung bei 95°C (ramp rate 20°C/ s), zehn Sekunden Annealing bei 55°C (ramp rate 20°C/s) und eine 15 Sekunden an dauernde Extensionphase bei 72°C (ramp rate 20°C/s). Die Primer für eNOS, nNOS, iNOS und Aldolase (housekeeping Gen) wurden von MWG Biotech (Ebersberg) synthetisiert und mittels einer konventionellen PCR auf ihre Spezifität überprüft (Sequenzen und Länge der PCR Produkte siehe Tabelle 3). Zusätzlich wurde am Ende jedes Laufs die Schmelzkurve erstellt (95°C, 0 s, ramp rate 20° C/s; 68°C, 30 s, ramp rate 20°C/s; 95°C, 0 s, ramp rate 0.1°C/s, kontinuierliche Messung). Als Standardkurve wurden für jedes Gen Verdünnungsreihen der cDNA erstellt ( $10^7 - 10^1$ ). Jede Probe wurde mindestens zweimal gemessen; in jedem Lauf wurde eine Wasser - Probe als Negativkontrolle sowie eine  $10^5$  - Standardverdünnung des jeweiligen Gens mitgemessen. Die Ergebniswerte wurden auf das Housekeeping-Gen Aldolase korrigiert, um eventuelle Schwankungen in der Ausgangs-RNA-Menge oder schwankende Effizienz der reversen Transkription auszugleichen.

Tabelle 3: Primer für die quantitative PCR

Gen	Primer vorwärts (5' - 3')	Primer rückwärts (5' - 3')	PCR Produkt
Aldolase	AGCTGTCTGACATCGCTCACCG	CACATACTGGCAGCGCTTCAAG	571 bp
eNOS	CTGGTACATGAGTTCAGAGATTGG	TAGTTGACCATCTCTTGATGGAAG	337 bp
nNOS	CTCGACCAATACTACTCCTCCATTA	TTGACGTGGTTACAGATGTAGTTG	255 bp
iNOS	ATCGACCCGTCCACAGTATGTG	CGACCTGATGTTGCCATTGTTG	493 bp

### 2.3.17 Statistische Analyse

Die statistische Analyse wurde computergestützt durchgeführt (Sigma Stat 3.0, Jandel Scientific, Erkrath). Die Ergebnisse sind – soweit nicht anders vermerkt – als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung (STABW) angegeben. Bei Vergleichen zwischen zwei Gruppen benutzten wir den Rank - Sum - Test (Mann - Whitney -Test), Vergleiche mehrerer Gruppen wurden mittels einer Varianzanalyse (ANOVA on ranks) verglichen. Mehrere Messungen innerhalb einer Gruppe wurden mit der Varianzanalyse für Mehrfachmessungen (ANOVA repeated measurements) auf signifikante Unterschiede geprüft. Ein p - Wert von unter 0,05 wurde als signifikant angesehen.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 90 - minütige NO - Inhalation

##### 3.1.1 Vitalparameter

Die Tiere dieser Versuchsreihe unterschieden sich zu Beginn des Versuchs nicht bezüglich Gewicht (Kontrolle:  $25,3 \pm 0,4$ g , iNO:  $26,9 \pm 1,5$ g) oder Vitalparametern (Tabelle 4).

Nach 90minütiger Intubationsnarkose kam es in beiden Gruppen zu einem Abfall des Blutglukosegehalts (Kontrolle:  $256 \pm 43$  mg/dl auf  $191 \pm 58,76$ ;  $p < 0,05$ . iNO:  $286 \pm 52$ , auf  $213, \pm 99$ ;  $p < 0,05$ ) auf vergleichbare Werte.

	pH Start	pH Ende	pO <sub>2</sub> Start	pO <sub>2</sub> Ende	pCO <sub>2</sub> Start	pCO <sub>2</sub> Ende
<b>Kontrolle</b>	$7,34 \pm 0,04$	$7,29 \pm 0,08$	$91 \pm 18$	$115 \pm 26$	$41 \pm 8$	$36 \pm 8$
<b>iNO</b>	$7,38 \pm 0,05$	$7,26 \pm 0,01$	$97 \pm 20$	$94 \pm 4$	$39 \pm 1$	$36 \pm 0,1$

	K <sup>+</sup> Start	K <sup>+</sup> Ende	Na <sup>+</sup> Start	Na <sup>+</sup> Ende	Ca <sup>2+</sup> Start	Ca <sup>2+</sup> Ende
<b>Kontrolle</b>	$5,2 \pm 0,9$	$5,1 \pm 0,8$	$138,5 \pm 10,3$	$136,9 \pm 9,9$	$1,5 \pm 0,5$	$1,4 \pm 0,2$
<b>iNO</b>	$4,6 \pm 0,1$	$4,9 \pm 0,8$	$131,6 \pm 17,1$	$132,4 \pm 8,3$	$1,2 \pm 0,1$	$1,3 \pm 0,2$

	Cl <sup>-</sup> Start	Cl <sup>-</sup> Ende	Glu start	Glu Ende	Lac Start	Lac Ende
<b>Kontrolle</b>	$96,9 \pm 14,1$	$99,1 \pm 15,5$	$256 \pm 43$	$191 \pm 59$	$1,1 \pm 0,5$	$1,1 \pm 0,6$
<b>iNO</b>	$102,2 \pm 9,9$	$101,8 \pm 18,4$	$287 \pm 52$	$213 \pm 99$	$1 \pm 0,6$	$1 \pm 0,1$

**Einheiten:** pO<sub>2</sub>, pCO<sub>2</sub>: mmHg. Kalium, Natrium, Calcium, Chlorid, Lactat: mMol/ l. Glucose: mg/ 100ml

Tabelle 4: Vitalparameter vor Beginn und nach 90 Minuten NO - Inhalation

### 3.1.2 Mittlerer arterieller Blutdruck

Vor Trauma betrug der mittlere arterielle Blutdruck bei den Kontrolltieren  $81,04 \pm 8,82$  mmHg und in der iNO - Gruppe  $87,75 \pm 12,82$  mmHg. Im Verlauf kam es narkosebedingt in beiden Gruppen zu einem gleichartigen, nicht signifikanten Abfall des systemischen Blutdrucks (Abbildung 18).

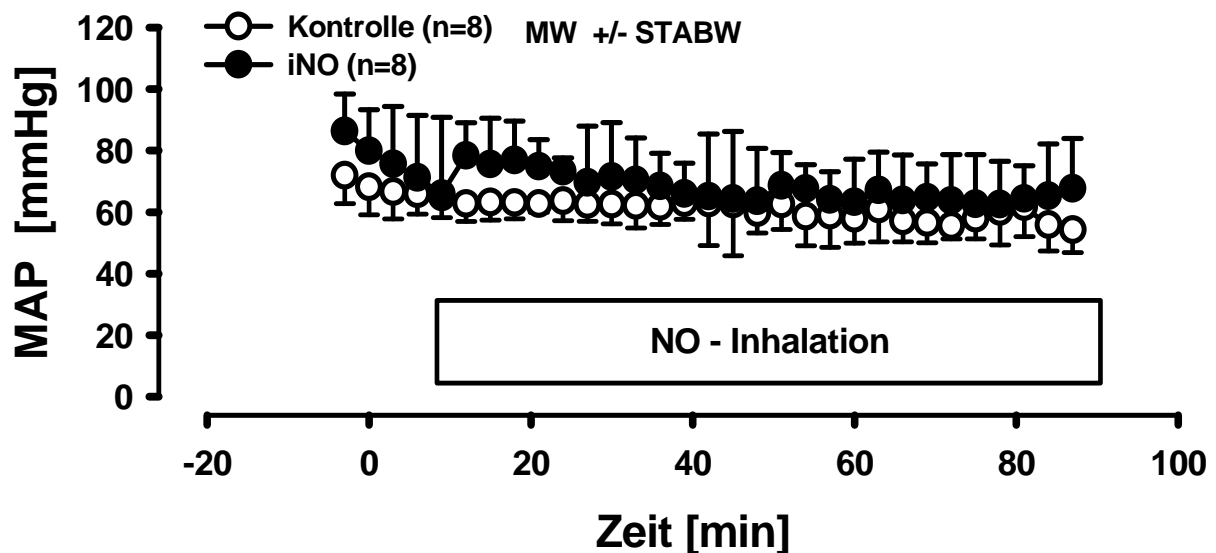


Abbildung 18: Verlauf des mittleren arteriellen Drucks nach CCI – Trauma in der Maus

### 3.1.3 Intrakranieller Druck

Nach der chirurgischen Präparation und vor Beginn der Messungen betrug der mittlere ICP  $3,32 \pm 1,25$  mmHg in der NO - Gruppe und  $2,98 \pm 0,95$  mmHg bei den Kontrolltieren ( $p=0,613$ ).

Wie Abbildung 19 zeigt, kam es in der unbehandelten Kontrollgruppe sofort nach Trauma zu einem annähernd linearen Anstieg des intrakraniellen Drucks. Direkt nach Trauma (Minute 3 nach Trauma) betrug der ICP  $6,2 \pm 3,0$  mmHg. Im Verlauf kam es zu einer Steigerung auf maximal  $28,7 \pm 9,7$  mmHg (Minute 78 nach Trauma). Zum Ende der Beobachtungszeit fiel der ICP wieder leicht ab ( $24,1 \pm 5,1$  mmHg in Minute 90). In der mit NO - Inhalation behandelten Gruppe zeigte sich bei vergleichbarem Baseline - Wert direkt nach Trauma ebenfalls ein Anstieg des ICP auf  $5,3 \pm 1,8$  mmHg (Minute 3 nach Trauma,  $p=0,786$ ) und  $6,5 \pm 2,4$  mmHg (Min. 6,  $p=0,620$ ). Nach Beginn der NO - Inhalation in der 10. Minute post Trauma stieg der ICP in

geringerem Ausmaß als in der Kontrollgruppe, ein Maximalwert von  $12,00 \pm 5,7$  mmHg wurde 81 min nach Trauma gemessen ( $p=0,001$  vs. Kontrolle).

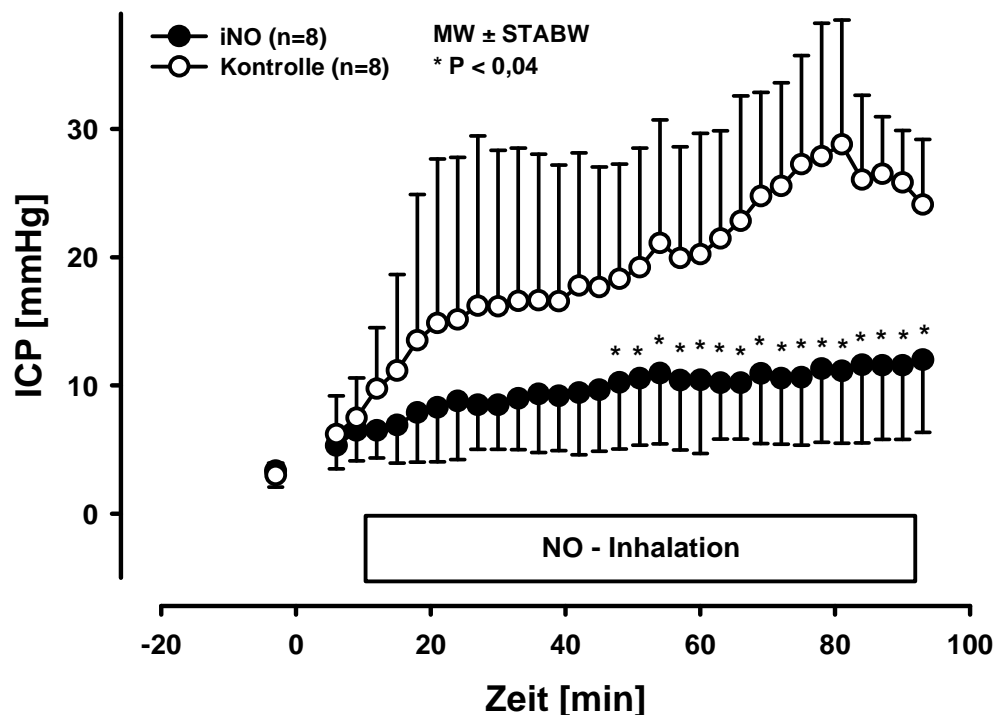


Abbildung 19: Verlauf des intrakraniellen Drucks nach Schädelhirntrauma

Ab dem Messzeitpunkt 48 Minuten nach Trauma wurden in der iNO - Gruppe signifikant niedrigere ICP - Werte gemessen ( $p < 0,04$ ).

### 3.1.4 Zerebrale Durchblutung nach Trauma

In der unbehandelten Kontrollgruppe kam es sofort nach Trauma zu einem Abfall der Durchblutung um 25 – 30 %. Die regionale Hirndurchblutung (rCBF) verblieb danach zunächst auf diesem Niveau, ab der 66. posttraumatischen Minute fiel sie signifikant gegenüber dem Ausgangswert ab ( $p < 0,05$ , Abbildung 20). Auch in der iNO - Gruppe erfolgte der anfängliche posttraumatische Abfall der regionalen Gehirndurchblutung. Nach Beginn der Inhalation mit Stickstoffmonoxid kam es jedoch sofort zu einer trendmäßigen Steigerung der Durchblutung. Der posttraumatische CBF - Abfall wurde durch die NO - Inhalation nicht nur gemindert, die Durchblutung kehrte ab der 45. posttraumatischen Minute sogar nahezu auf Ausgangswerte zurück. Über den Beobachtungszeitraum kam es innerhalb der iNO - Gruppe also im Gegensatz zur

Kontrollgruppe zu keinem signifikanten Abfall des CBF, die Durchblutung war ab der 63. Minute post Trauma signifikant höher als bei den unbehandelten Kontrolltieren ( $p < 0,05$ ).

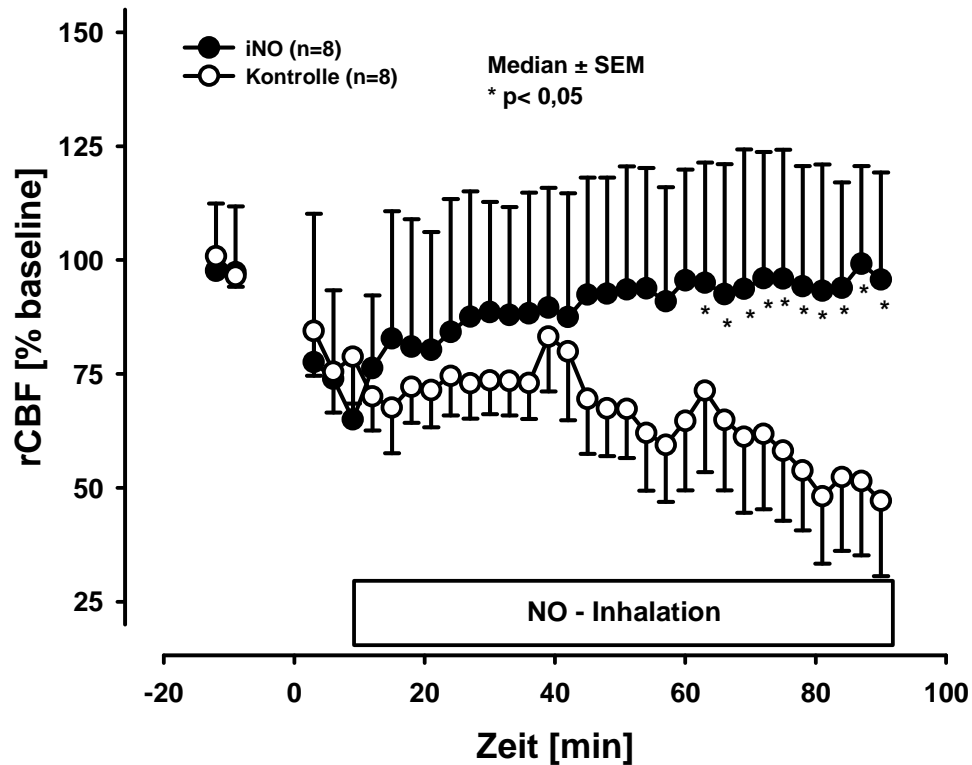


Abbildung 20: Regionale Hirndurchblutung nach SHT, Messung über dem zum Trauma kontralateralen Media - Stromgebiet

In der ipsilateralen Hemisphäre zeigt sich trendmäßig ein ähnlicher Verlauf der zerebralen Durchblutung (Abbildung 21). Die Messung erwies sich über dem zum Trauma ipsilateralen Kortex als technisch schwierig: Unmittelbar im Gebiet des Primärschadens kommt die Durchblutung sofort nach Trauma fast zum Erliegen und kann auch therapeutisch nicht wiederhergestellt werden. Aufgrund anatomischer und technischer Gegebenheiten kann beim Anbringen der LDF - Sonde ipsilateral jedoch nicht immer ausgeschlossen werden, dass teilweise über dem Gebiet der Kontusion gemessen wird. Deswegen weisen die gemessenen Werte eine größere Streuung auf; die ipsilateral gezeigten Veränderungen sind statistisch nicht signifikant.

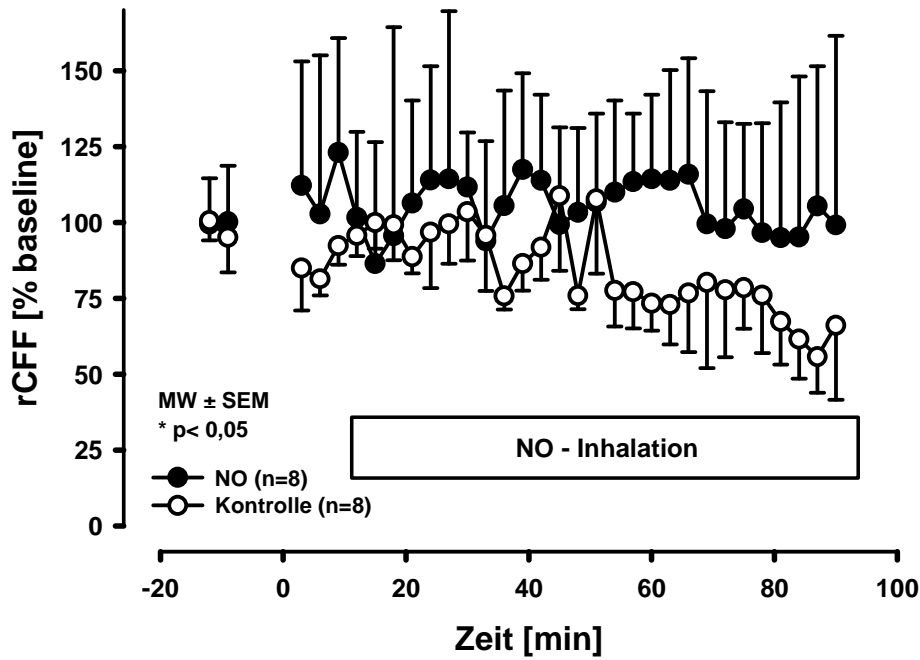


Abbildung 21: Posttraumatischer Verlauf der zerebralen Durchblutung in der traumatisierten Hemisphäre (ipsilateral zum Trauma)

Trägt man alle posttraumatisch erhobenen CBF - Werte der Kontrollgruppe gegen den intrakraniellen Druck auf (Abbildung 22, weiße Punkte), zeigt sich deutlich, dass

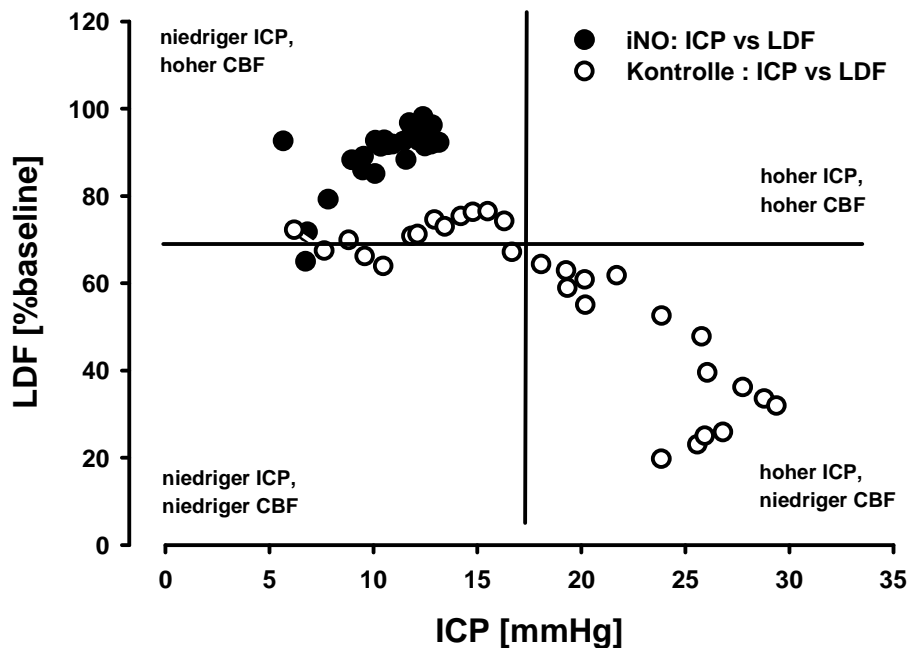


Abbildung 22: Posttraumatische Durchblutungswerte, aufgetragen gegen den jeweiligen CBF

bei ansteigendem ICP die Durchblutung des Gehirns zunächst in ausreichender Weise aufrecht erhalten wird (bis ca. 70% des Ausgangswerts). Steigt jedoch der



ICP über 17 mmHg, sind die Kompensationsmechanismen erschöpft, es kommt zu einer dramatischen Abnahme der zerebralen Durchblutung. Die meisten der posttraumatisch in der Kontrollgruppe erhobenen Werte fallen in die Kategorie „hoher ICP, niedriger CBF“, eine Konstellation, die bei Patienten prognostisch äußerst ungünstig ist. In der iNO -Gruppe hingegen wird die posttraumatische intrakranielle Hypertension stark gemindert; fast alle Messungen zeigen eine angemessene Durchblutung bei nur geringem ICP - Anstieg.

## **3.2 Nekrosevolumina nach längerfristiger Beatmung mit 50 ppm NO**

### **3.2.1 24h iNO**

Der Primärschaden in unserem Modell beläuft sich auf  $19,2 \pm 5,2 \text{ mm}^3$ . Unbehandelt wächst die Nekrose innerhalb von 24 Stunden signifikant auf  $33,6 \pm 3,7 \text{ mm}^3$  an ( $p < 0,001$ ).

In der iNO - Gruppe kommt es innerhalb 24 Stunden ebenfalls zu einem Anwachsen der ursprünglichen Läsion auf  $28,95 \pm 3,7 \text{ mm}^3$  ( $p = 0,002$ ); die sekundäre Nekroseexpansion ist jedoch in dieser Gruppe signifikant geringer ausgeprägt als bei den unbehandelten Kontrolltieren ( $p = 0,039$ ). Dies entspricht einer Reduktion des sekundären Nekrosewachstums um 32,4% (Abbildung 23).

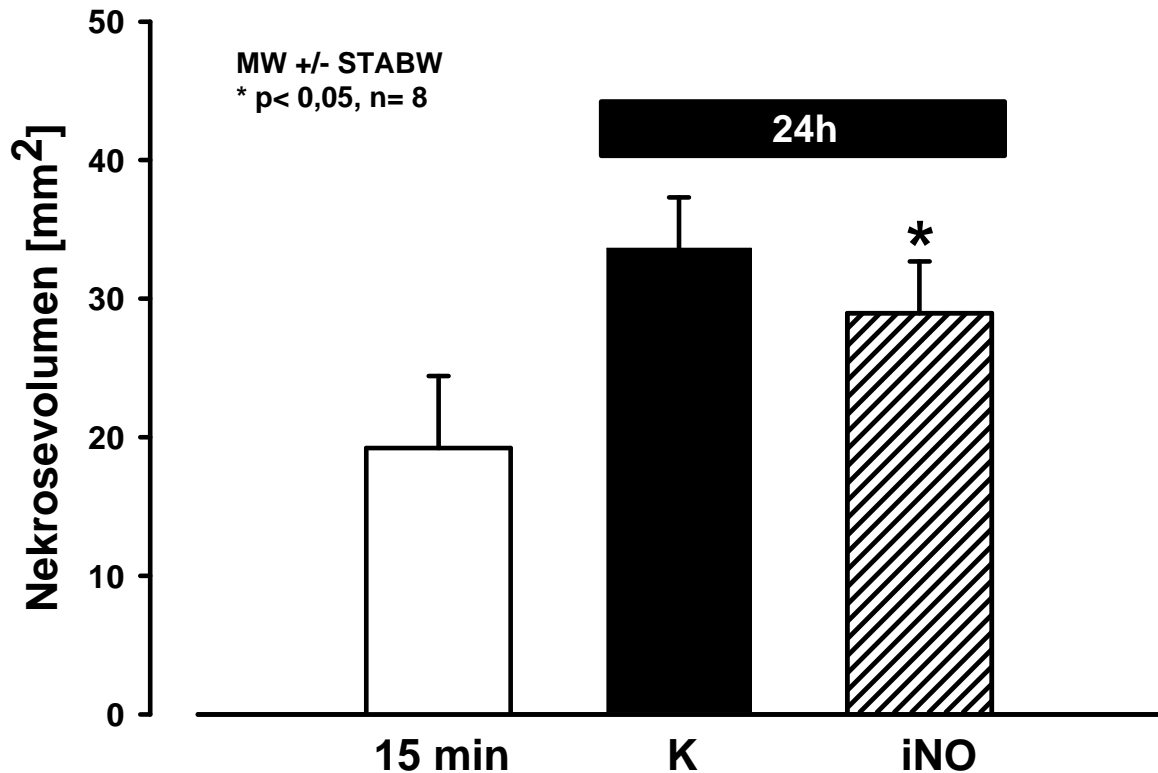


Abbildung 23: Einfluss der NO - Inhalation (24 Stunden, Beginn 10 Minuten nach Trauma) auf das sekundäre Nekrosewachstum

### 3.2.2 Verzögerter Beginn der längerfristigen NO - Beatmung

Auch bei verzögertem Beginn der NO - Inhalation kam es in allen Gruppen zu signifikantem sekundärem Nekrosewachstum ( $p < 0,01$  vs. 15 min, Abbildung 24). Wurde mit der NO - Inhalation eine Stunde nach Trauma begonnen, zeigte sich die Nekrose nach 24 Stunden mit  $27,6 \pm 5,4 \text{ mm}^3$  geringer als in der Kontrollgruppe (1h iNO vs. C:  $p=0,022$ ). Der Effekt der NO - Inhalation scheint dosisabhängig zu sein: Ein Beginn der NO - Inhalation nach 2 und nach 3 Stunden führte zwar zu einer Verringerung des Läsionsvolumens nach 24 Stunden gegenüber der Kontrollgruppe, diese Veränderungen waren jedoch nicht statistisch signifikant ( $30,6 \pm 4,7 \text{ mm}^3$ ,  $29,9 \pm 7,4 \text{ mm}^3$ ).

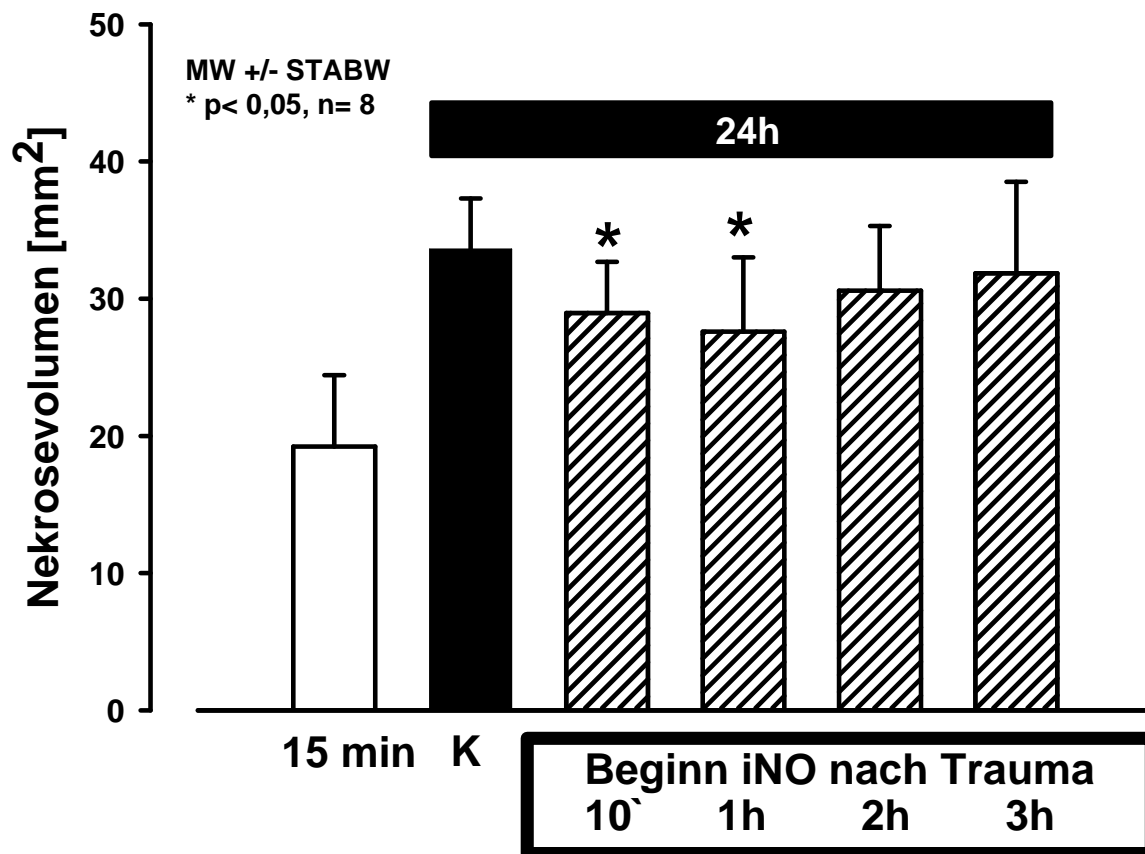


Abbildung 24: Einfluss der NO - Inhalation auf das Nekrosevolumen nach 24 Stunden. Zur Verdeutlichung des dosisabhängigen Effekts der NO - Inhalation wurden die Daten aus 3.2.1. (Beginn von iNO nach 10 Minuten) in die Abbildung miteinbezogen

### 3.2.3 NO - Inhalation in den ersten 12 bzw. 18 Stunden nach Trauma

Wurde die NO - Inhalation 10 Minuten nach Trauma begonnen und dann nach 12 bzw. 18 Stunden beendet, stieg das Nekrosevolumen von  $23,9 \pm 3,3 \text{ mm}^3$  (Zeitpunkt 15 Minuten) nach 24 Stunden auf  $32,5 \pm 7,2 \text{ mm}^3$  bzw.  $31,1 \pm 5,2 \text{ mm}^3$  (Abbildung 25). Während die 24 Stunden andauernde NO - Inhalation das sekundäre Läsionswachstum gegenüber den Kontrolltieren signifikant reduzierte ( $28,95 \pm 3,7 \text{ mm}^3$ ,  $p=0,042$ ), verringerte die 12 - und 18 - stündige iNO - Therapie es im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe ( $34,7 \pm 6,9 \text{ mm}^3$ ) nur trendmäßig. Insgesamt zeigt sich aber auch in dieser Versuchsreihe ein dosisabhängiger Effekt der NO - Inhalation auf den sekundären Hirnschaden.

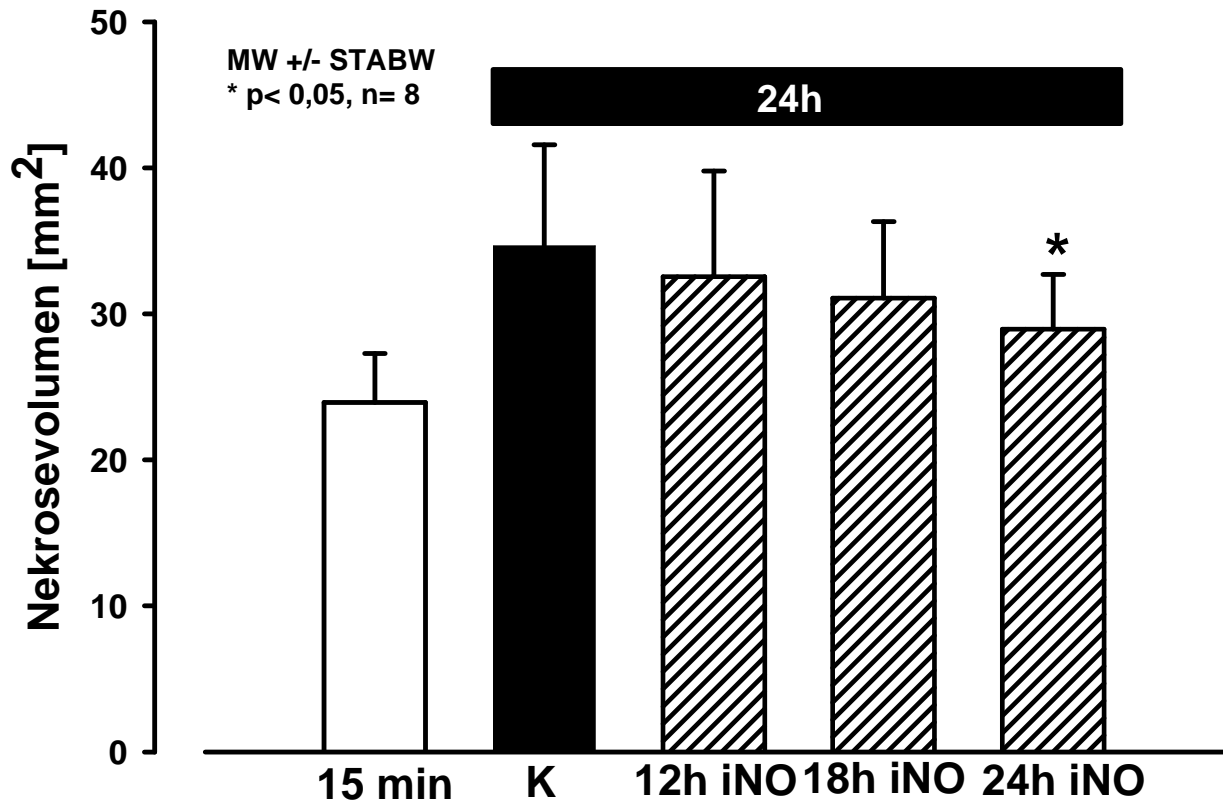


Abbildung 25: 12, 18 und 24 stündige NO - Inhalation nach SHT

### 3.2.4 Intermittierende NO - Inhalation

Bei intermittierender Anwendung der NO -Inhalation (Beginn zehn Minuten nach Trauma, danach jeweils drei Stunden Zugabe von 50 ppm NO, danach 1 Stunde Pause) stellten wir nach 24 Stunden in der NO - Gruppe ein Läsionsvolumen von  $33,9 \pm 2,5 \text{ mm}^3$  fest, in der dazugehörigen Kontrolle lag es nichtsignifikant höher bei  $35,4 \pm 4,3 \text{ mm}^3$  (Abbildung 26). Eine kontinuierliche Durchführung der NO - Inhalation über 24 Stunden (siehe 3.2.1.) hingegen führt zu einer signifikanten Reduktion des sekundären Hirnschaden.

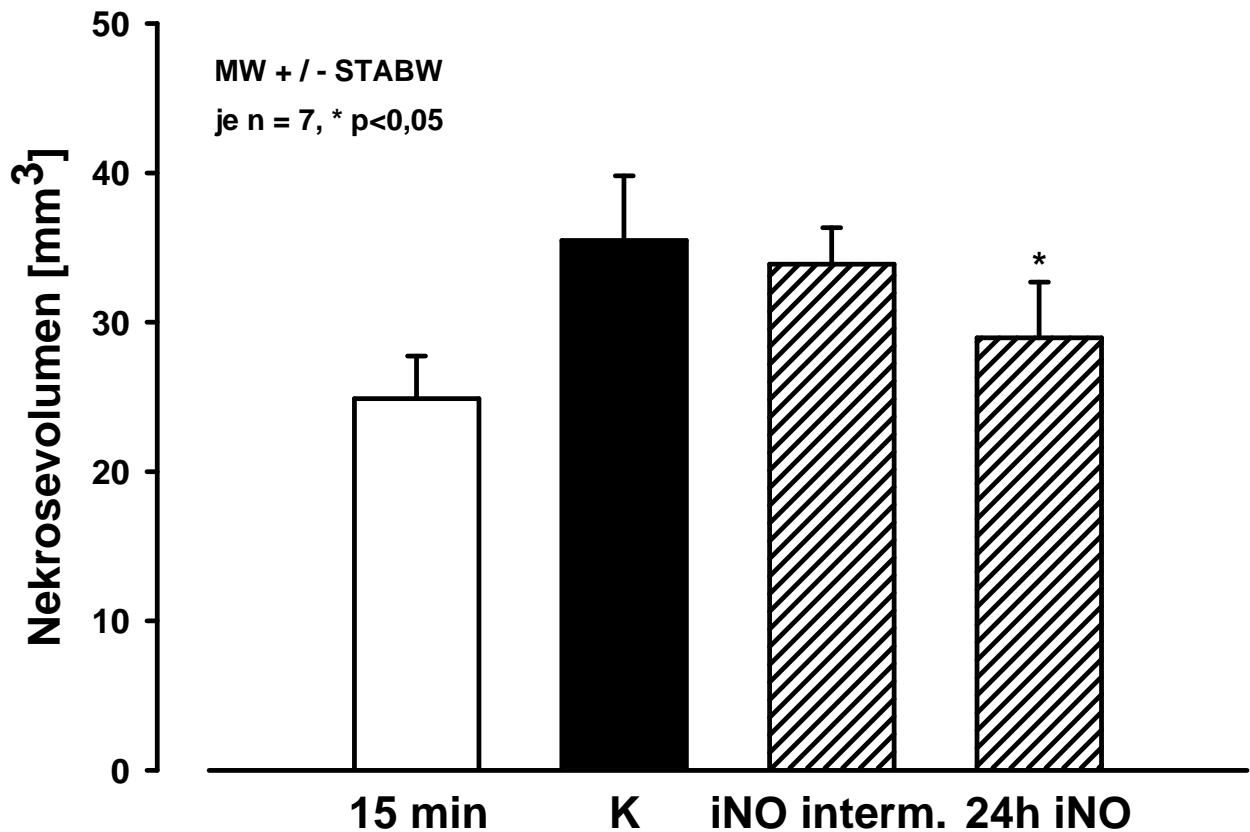


Abbildung 26: Einfluss der intermittierenden NO - Inhalation auf das Nekrosevolumen 24h nach SHT

### 3.3 Ausbildung des posttraumatischen Hirnödems unter iNO

Bei der gesunden bzw. der scheinoperierten C57/Bl 6 Maus beträgt der Wassergehalt des Gehirnparenchyms 79%.<sup>394</sup> In der vorliegenden Studie betrug der der Hirn - Wassergehalt 24 Stunden nach Trauma (Abbildung 27) in der nicht traumatisierten linken Hemisphäre in der Kontrollgruppe  $80,4 \pm 1,4\%$  des Ausgangsgewichts des Gehirns. Bei Tieren, die 24h 50 ppm iNO zusätzlich zur Atemluft erhalten hatten, ergab sich  $80,7 \pm 0,8\%$  des Feuchtgewichts (n. s. vs. Kontrollgruppe). In der traumatisierten rechten Hemisphäre der Kontrolltiere war der Wassergehalt gegenüber der kontralateralen Seite signifikant auf  $82,4 \pm 0,8\%$  erhöht ( $p=0,007$ ), in der Therapiegruppe kam es ebenfalls zu einem signifikanten Anstieg auf  $81,7 \pm 0,5\%$  (NO rechts vs. NO links  $p=0,042$ ). Diese Zunahme des Wassergehalts war jedoch signifikant geringer ausgeprägt als in den rechten Hemisphären der Kontrolltiere ( $p=0,014$ ). Die posttraumatische Ödemformation wurde somit durch iNO in der traumatisierten rechten Hemisphäre um 30% reduziert.

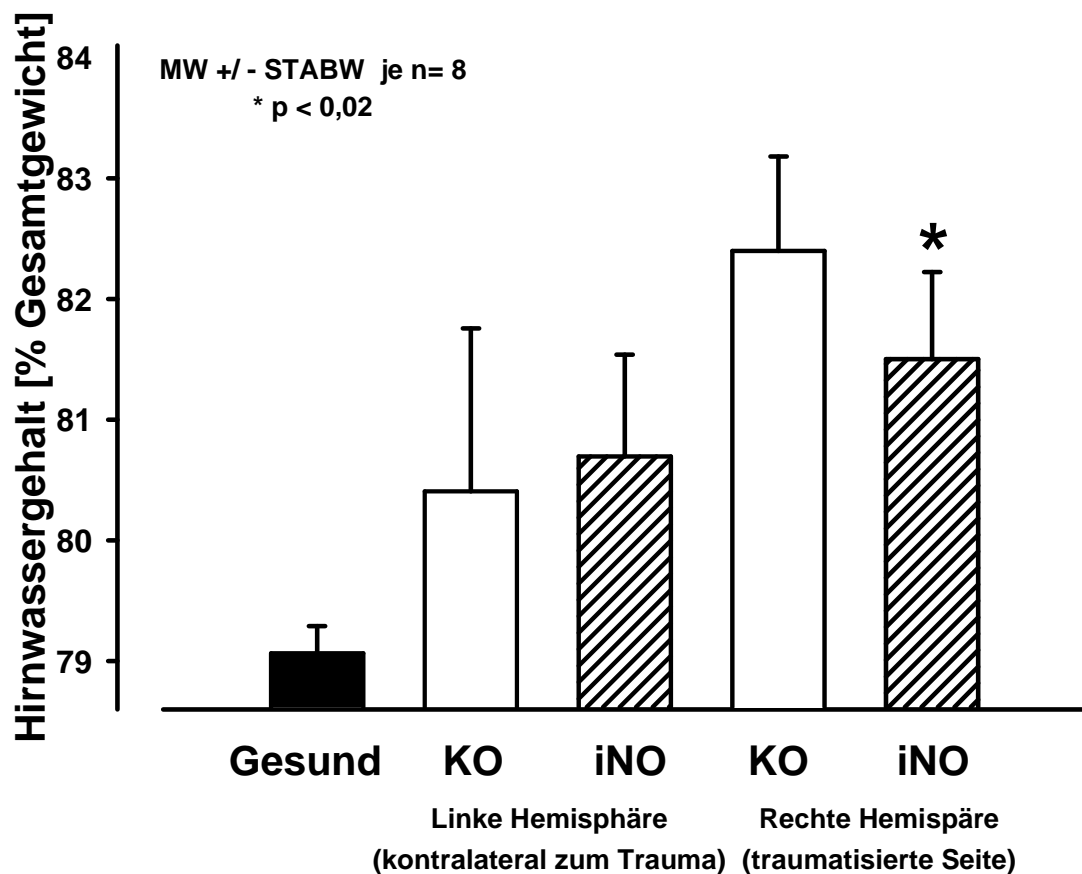


Abbildung 27: Hirnwassergehalt nach experimentellem Schädelhirntrauma

### 3.4 Nitrosyl - Hämoglobin - Bestimmung

In unserem Versuchsaufbau betrug der Ausgangswert der Nitrosyl - Hämoglobinkonzentration im Blut von narkotisierten C57/black6 Mäusen  $0,38 \pm 0,19 \mu\text{M}$ , nach 30 - minütiger Beatmung mit 50 ppm Stickstoffmonoxid stieg der NO - Hb - Gehalt um mehr als das Dreifache auf  $1,2 \pm 0,15 \mu\text{M}$  ( $p=0,008$ , Abbildung 28a).

Bei männlichen Sprague - Dawley - Ratten (Abbildung 28b) betrug der Baseline - Wert  $0,08 \pm 0,06$ . Nach NO - Inhalation (30 Minuten) zeigte sich ein 18facher Anstieg der S - NO - Hb - Konzentration auf  $1,51 \pm 0,47 \mu\text{M}$  (BL vs. 30 min:  $p=0,008$ ). 30 Minuten nach Beendigung der NO - Inhalation war der S - NO - Gehalt gegenüber dem Ausgangswert weiterhin achtfach erhöht ( $p=0,008$ ).

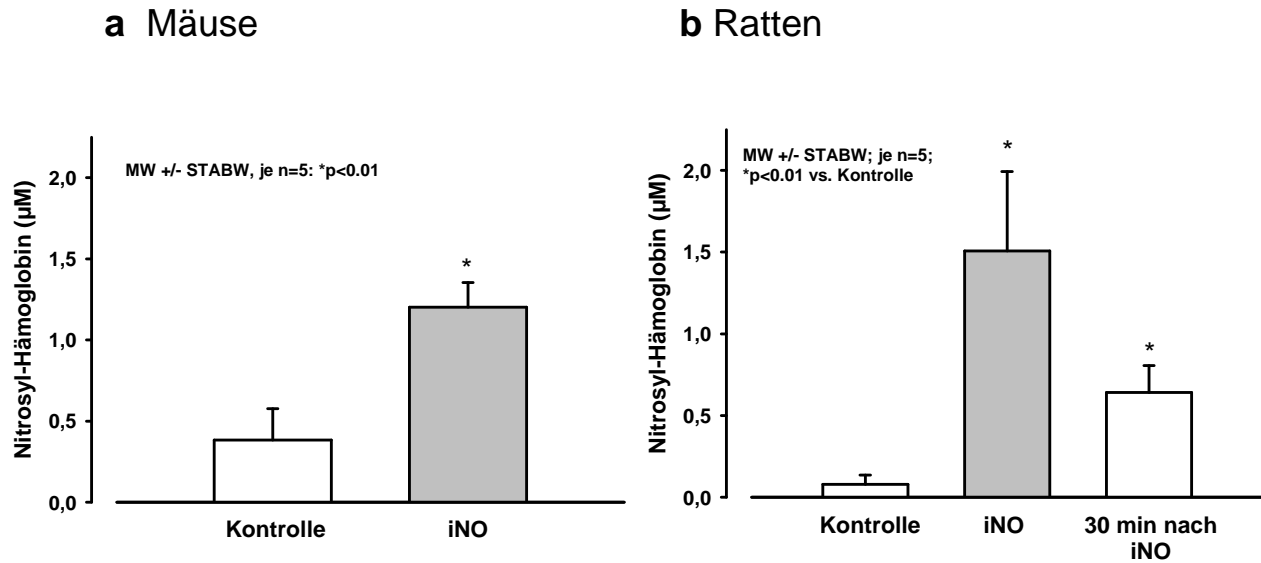


Abbildung 28: Nitrosyl-Hämoglobingehalt im arteriellen Blut von (a) Mäusen und (b) Ratten unter Kontrollbedingungen, nach 30minütiger Behandlung mit iNO und 30 min nach Ende der NO - Inhalation

### 3.5 Nitrit - Nitrat - Messung

Unter Baseline - Bedingungen fanden sich für die Nitrit/Nitrat - Gesamtkonzentration folgende Werte: iNO: arteriell  $0,70 \pm 0,3$  pM, venös:  $0,56 \pm 0,2$  pM. Kontrollgruppe: arteriell:  $0,79 \pm 0,3$  pM, venös:  $0,70 \pm 0,2$  pM). Zwischen beiden Gruppen und zwischen arteriellem und venösen Blut fand sich kein statistisch signifikanter Unterschied (Abbildung 29a).

Nach 30 minütiger NO - Inhalation ließ sich ein signifikanter Anstieg der Stickstoffmonoxid-Folgeprodukte (Nitrit + Nitrat) um mehr als das Doppelte im arteriellen sowie im venösen Blut nachweisen (A:  $1,9 \pm 0,27$ pM, V:  $1,66 \pm 0,23$ pM) – sowohl gegenüber den Ausgangswerten ( $p < 0,05$ ) als auch der Kontrollgruppe (Kontrolle Arterie:  $0,65 \pm 0,21$  pM,  $p < 0,001$ . Vene:  $0,74 \pm 0,55$  pM,  $p = 0,001$ ); dieser Unterschied blieb auch 30 Minuten nach Beendigung der NO - Inhalation erhalten (A:  $1,87 \pm 0,56$  pM, V:  $1,85 \pm 0,41$  pM. Kontrolle A:  $0,96 \pm 0,43$ , V:  $0,67 \pm 0,25$  pM;  $p = 0,001$ ). Die Konzentration von Nitrit, das als möglicher Träger und Bewahrer der NO - Bioaktivität im Gespräch ist, verändert sich unter und nach NO - Inhalation nicht (Abbildung 29b).

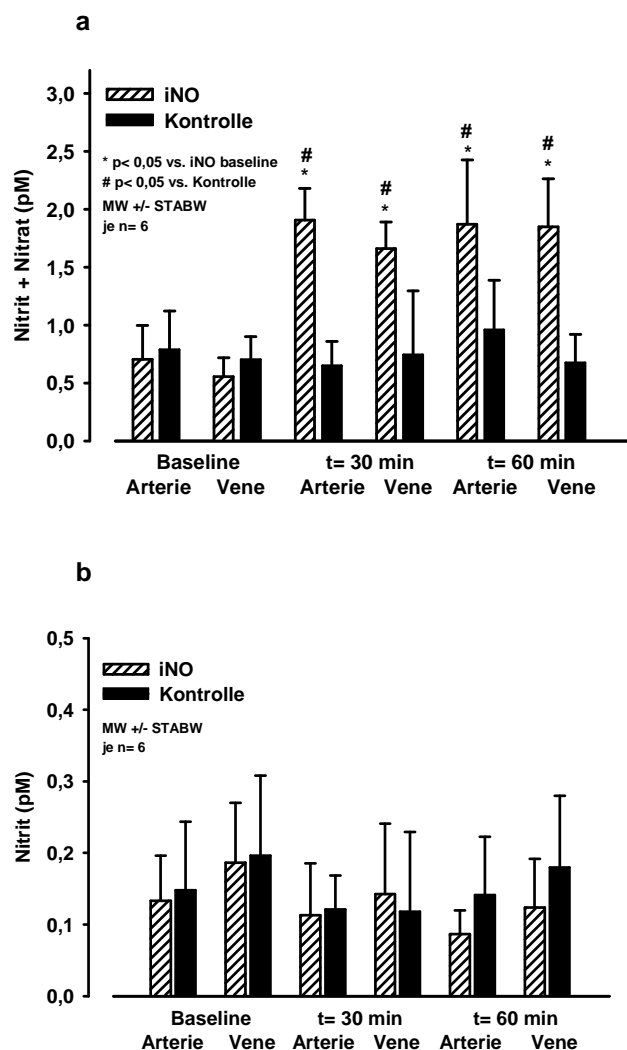


Abbildung 29. Arterielle und venöse Konzentration von (a) Gesamt - Nitrit/ Nitrat und (b) Nitrit vor, unter und nach NO - Inhalation

Nach Diskussion dieser Ergebnisse mit Experten im Gebiet der Messung von NO und NO - Addukten im Blut kamen wir zu dem Schluss, dass die angewandte Messmethode angesichts der Instabilität von Nitrit im Plasma zu ungenau gewesen sein könnte. Deswegen wurden die Experimente wiederholt, um die Nitritkonzentration im Mausplasma in Kollaboration mit einem führenden Labor (Prof. R.P. Patel, University of Alabama, Birmingham, AL) mittels der deutlich exakteren Chemiluminiszenz - Technik erneut zu bestimmen.

Nach 30 - minütiger NO - Inhalation zeigte sich hier ein signifikanter Anstieg der Nitritkonzentration im arteriellen Blut (Abbildung 30): Die Nitritkonzentration bei den iNO - Tieren betrug mit  $258 \pm 42$  nM mehr als das Doppelte des bei Kontrolltieren nachgewiesenen Werts ( $124 \pm 58$  nM).



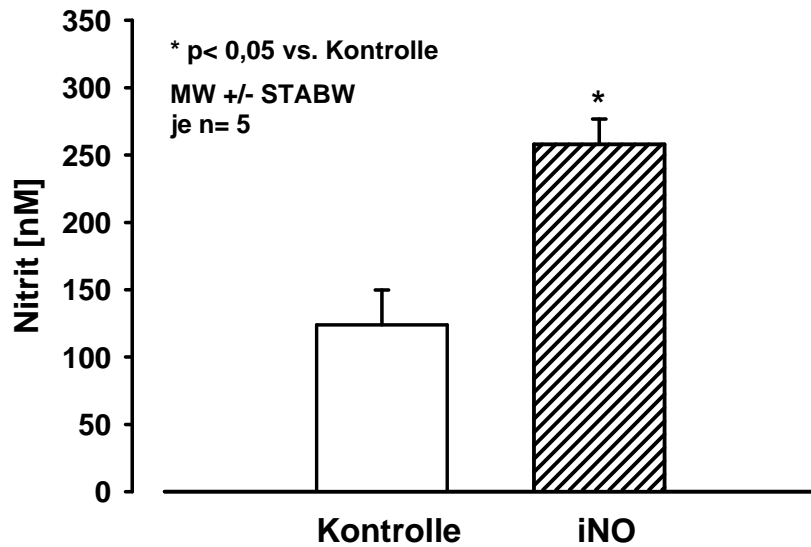


Abbildung 30: Nitritkonzentration im arteriellen Blut bei Kontrolltieren und Tieren nach 30minütiger NO - Inhalation. Messung mittels der Chemiluminiszenz - Technik

### 3.6 Bestimmung von S - Nitroso - Hämoglobin

Unter physiologischen Bedingungen zeigte sich im arteriellen Blut gesunder C57/Bl6 Mäusen  $1,4 \pm 2,1$  nM S - Nitroso - Hämoglobin. Nach 30 Minuten andauernder NO - Inhalation stieg dieser Wert deutlich auf  $4,7 \pm 3,0$  nM, jedoch ergab sich gegenüber den Kontrolltieren kein signifikanter Anstieg (Abbildung 31).

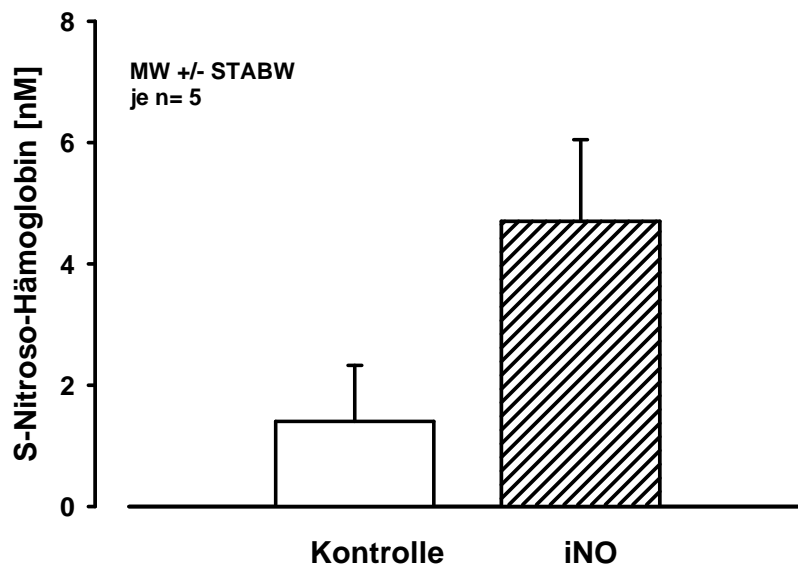


Abbildung 31: S - Nitrosohämoglobin - Konzentration im arteriellen Blut von Kontrolltieren und Tieren nach 30 minütiger NO - Inhalation

### 3.7 Blutungszeit

Die Ausgangswerte der Blutungszeit betragen in der Kontrollgruppe  $144,6 \pm 25,5$ s und in der iNO -Gruppe  $149 \pm 44$  s ( $p=0,731$ ). Nach 30 minütiger NO -Inhalation kam es in der Therapie - Gruppe zu einem nichtsignifikanten Anstieg auf  $187 \pm 54$  s, 30 Minuten nach Beenden der NO - Gabe sistierte die Blutung aus der standardisierten Läsion nach  $160,5 \pm 34,5$ s (Baseline vs. 30 min: $p=0,132$ ; BL vs 60 min:  $p=0,485$ ; 30 min vs. 60 min:  $p=0,589$ . ANOVA on ranks  $p=0,304$ , Abbildung 32). In der Kontrollgruppe betrug die Blutungszeit nach 30 Minuten  $175,1 \pm 32,4$ s und nach 60 Minuten  $203 \pm 25,7$ s. Zwischen den beiden Gruppen besteht kein statistisch signifikanter Unterschied ( $p=0,052$ ; iNO BL vs. C BL  $p=0,731$ ; iNO 30 min vs. C 30 min:  $p=0,945$ ; iNO 60 min vs. C 60 min : $p=0,051$ ).

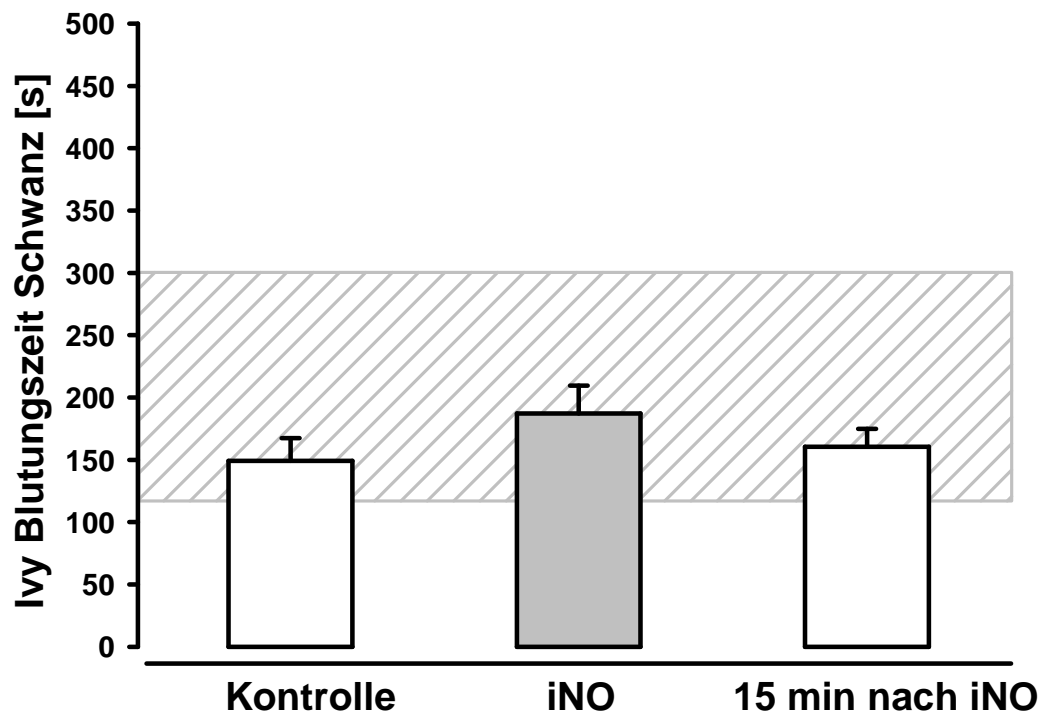


Abbildung 32: Blutungszeit vor, unter und nach NO - Inhalation. Grau schraffiert die physiologischen Grenzwerte

### 3.8 Protein - Nitrosylation

Nach 24 Stunden NO - Inhalation zeigte sich im Gehirnparenchym im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe kein Unterschied: sowohl Kontroll - als auch iNO - Gruppe weisen in der Immunhistochemie nur wenige für Nitrotyrosin schwach positive Zellen auf (Abbildung 33).

### 3.9 Expression der NO - Synthasen im Gehirn

Die Expression der endothelialen, der neuronalen und der induzierbaren NO - Synthase (Abbildung 34) wurde durch 24 stündige NO - Inhalation nicht beeinflusst.

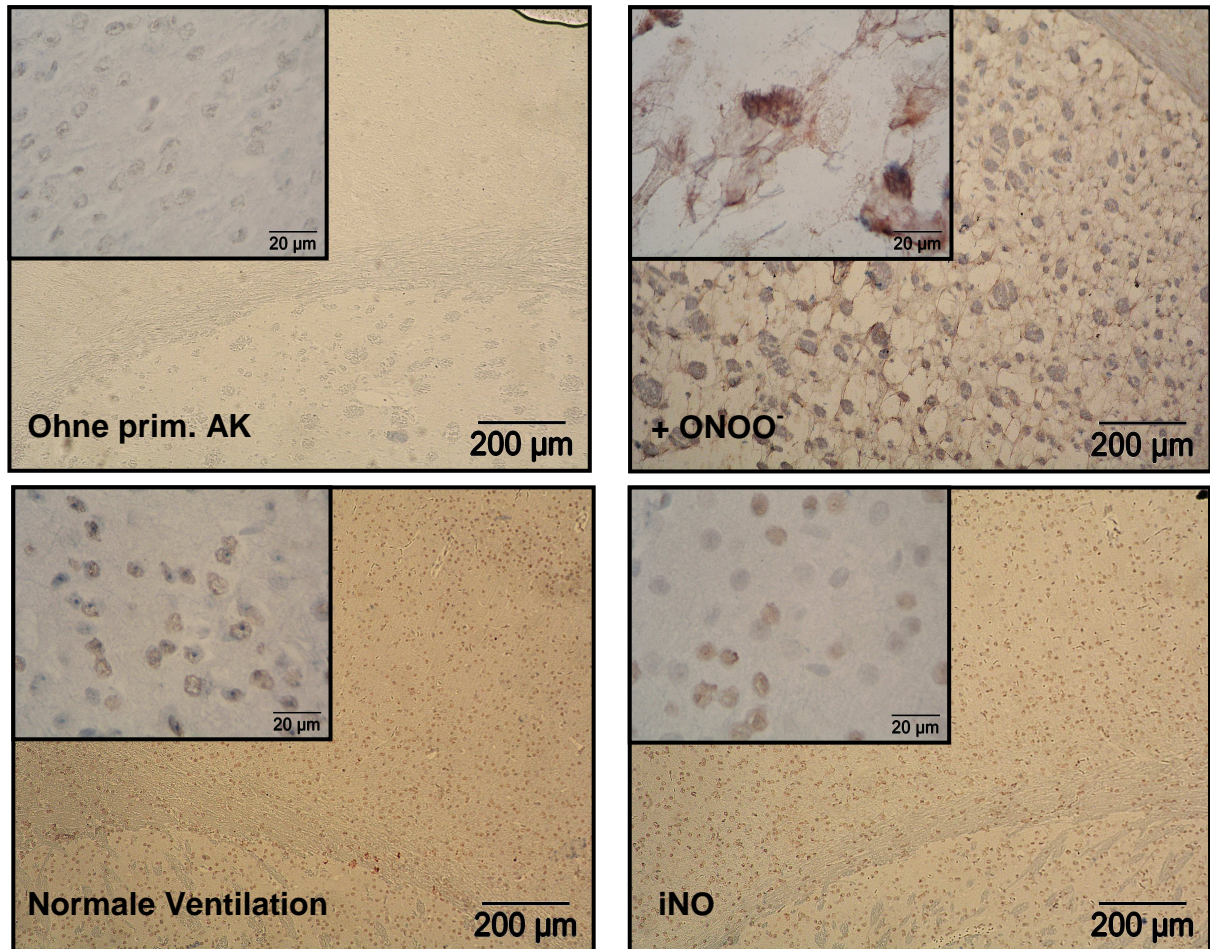


Abbildung 33. Proteinnitrosylierung im Gehirn gesunder C57/Bl 6 Mäuse. Ohne primären Antikörper findet keine Anfärbung statt; als Positivkontrolle behandelten wir Schnitte mit Peroxynitrit (ONOO<sup>-</sup>) vor

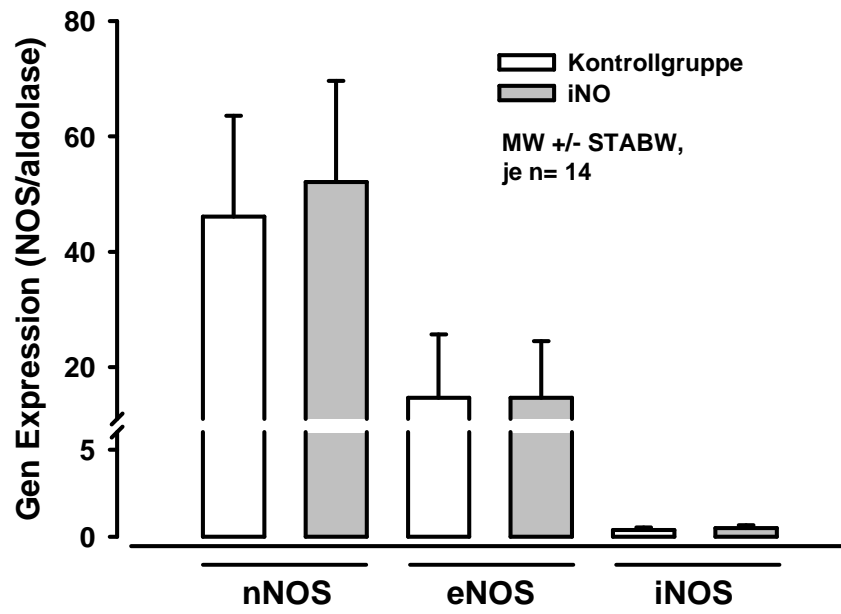


Abbildung 34. Expression aller NO - Synthase - Isoformen unter normaler Ventilation und NO – Inhalation

## 4 Diskussion

### 4.1 Diskussion der Methode

#### 4.1.1 Auswahl des experimentellen Trauma-Modells

Das Schädelhirntrauma ist eine ätiologisch uneinheitliche Erkrankung mit komplexer Pathophysiologie. Es wird deshalb nicht gelingen, sämtliche relevanten Vorgänge in einem experimentellen Tiermodell abzubilden.

Seit den frühen 70er Jahren wurde eine Reihe von Tiermodellen entwickelt, um die Pathophysiologie des Schädelhirntraumas zu untersuchen.

Bei dem von Marmarou entwickelten Weight drop - Modell<sup>239</sup> wird ein Gewicht, das sich in einer Führungsröhre aus Plexiglas befindet, aus definierter Höhe senkrecht auf die geschlossene Schädelkalotte fallen gelassen. Um Knochenbrüche (also ein offenes SHT) zu vermeiden, wird dort, wo das Gewicht auftrifft, eine Metallplatte (steel „helmet“) auf dem Schädelknochen fixiert. Außerdem liegt das Tier auf einer dicken Schaumstoffmatte, ebenfalls um den direkten Impuls durch das Gewicht abzufangen. Dieses experimentelle Schädelhirntrauma - Modell, das hauptsächlich für die Ratte (und andere größere Nager) als Versuchstier geeignet ist, führt zu diffusem Axonschaden, Subarachnoidalblutungen (SAB), Neuronenverlust im Hippocampus und Parenchymruptur, aber nicht zu Kontusionen.<sup>205, 287</sup> Der posttraumatische ICP-Anstieg bleibt fast vollständig aus, außerdem korreliert der Schaden nicht wie beim Patienten mit ICP-Erhöhung oder CBF-Abfall.<sup>205</sup>

Weiterhin gibt es das sogenannte Fluid percussion Modell. Hierbei wird zunächst der Schädelknochen freigelegt und entweder lateral oder medial eine Kraniotomie angelegt. Danach wird mit einem Pendel sehr schnell Flüssigkeit in das geschlossene Krania injiziert.<sup>58, 74, 240, 323, 361</sup>

Das Fluid Percussion Modell führt ebenfalls eher zu selektiven Hippocampus - Neuronenzelluntergang und Hirnstammschädigung.<sup>58</sup>

Das in der vorliegenden Studie verwendete Controlled Cortical Impact - Modell wurde 1988 von Lighthall am Frettchen entwickelt<sup>221, 222</sup> und in den folgenden Jahren auch für andere Spezies etabliert.<sup>72, 328</sup> Der pathophysiologische Fokus liegt in diesem Modell auf der Kontusion, die beim Menschen in über 2/3 der Fälle beim schweren Schädelhirntrauma vorliegt,<sup>3</sup> morphologisch kommt es wie beim Menschen vor allem in den Pedunculi cerebri zu Nervenzell-Nekrosen.<sup>72</sup> Akute und chronische posttraumatische Defizite der neurologischen Funktion können mit dem CCI - Modell bei der Ratte und bei der Maus<sup>73, 89, 137</sup> abgebildet werden und korrelieren gut mit der

Verletzungsschwere. Diese Modell wurde vor einigen Jahren in unserer Arbeitsgruppe für die Maus als Versuchstier etabliert.

Der systemische Blutdruck, die zerebrale Durchblutung, die Ausbildung eines Hirnödems, der posttraumatische intrakranielle Druckanstieg sowie das sekundäre Nekrosewachstum können in unserem Versuchsaufbau im Mausmodell gut abgebildet und überwacht werden und entsprechen in ihrem Verlauf den Daten, die an Trauma-Patienten erhoben wurden.<sup>73, 121, 150, 226</sup>

Ein weiterer entscheidender Punkt für die Verwendung der Maus als Versuchstier war die Tatsache, dass die Rolle von NO und der NO - Synthasen unter physiologischen Bedingungen und nach verschiedenen zerebralen Insulten im Mausmodell bereits eingehend untersucht wurde und somit Anhaltspunkte über den posttraumatischen Verlauf der NO - Konzentration und der NOS - Expression vorlagen.<sup>72, 102, 150, 155, 387, 393</sup>

Das CCI - Modell und die Maus als Versuchstier erscheinen deswegen angemessen, um die pathophysiologischen Vorgänge nach Schädelhirntrauma und die NO - Inhalation als mögliche Therapie zu untersuchen.

#### **4.1.2 Durchblutungsmessung mit der Laser – Doppler – Fluxmetrie**

Es gibt viele Möglichkeiten zu Messung der zerebralen Durchblutung bei Versuchstieren.

Der Goldstandard für die Quantifizierung der Hirndurchblutung ist die C<sub>14</sub> – Autoradiographie: dabei wird radioaktiv markierter Kohlenstoff intravenös zugeführt; dieser verteilt sich dann abhängig von der Durchblutung und erlaubt die absolute Bestimmung der Durchblutung im ganzen Gehirn.<sup>177, 314</sup> Diese Methode erfordert jedoch die Tötung des Versuchstieres und ist somit für eine Verlaufsbeobachtung ungeeignet. Dasselbe gilt für die Durchblutungsmessung mit radioaktiv oder fluoreszierend markierten Mikrosphären.<sup>145</sup>

Bei Indikatorverfahren wird ein bestimmter Marker (Wasserstoff,<sup>17</sup> Helium, Wärme) zugeführt, der sich dann abhängig vom CBF verteilt. Aus dem Konzentrationsabfall des Indikators an einem Messpunkt lassen sich dann relative Durchblutungswerte errechnen. Dies erfordert jedoch die Platzierung einer Messsonde,<sup>345</sup> was angesichts des geringen Volumens des Mausgehirns problematisch ist, da das Parenchym zusätzlich traumatisiert wird und ein raumfordernder Effekt zu erwarten ist.

Die geringste Invasivität bei guter räumlicher und zeitlicher Auflösung lässt sich mit der kernspintomographischen Messung<sup>359, 360, 370</sup> oder mittels Positronenemissionstomographie (PET)<sup>388</sup> erreichen. Die Geräte sind jedoch sehr teuer und nicht überall verfügbar; außerdem ist die Zahl der Messungen durch die Notwendigkeit einer Kontrastmittelapplikation limitiert. Für unsere Zwecke wäre diese Methode schlecht geeignet gewesen: Die kontinuierliche ICP - Messung und ihre Korrelation mit den Durchblutungswerten ist ein wichtiger Teil unserer Studie. Die Verwendung der metallhaltigen Hirndrucksonde wäre wegen Artefaktbildung/Erwärmung nicht möglich gewesen.

Die Laser - Doppler - Fluxmetrie<sup>339</sup> erlaubt die nichtinvasive, kontinuierliche und längerfristige Messung der zerebralen Durchblutung<sup>30, 383</sup> auch kleiner Nager, da die Messung durch die Schädelkalotte durchgeführt werden kann. Bewegungsartefakte können durch die Fixierung der Glasfasersonde mit Sekundenkleber minimiert werden. Da die Eindringtiefe nur zirka 1,5 mm beträgt, beschränkt sich die Messung jedoch auf Gefäße der Hirnoberfläche. Im Vergleich mit der Autoradiographie und anderen Verfahren zeigt sich eine gute Korrelation von LDF - Werten und tatsächlicher Durchblutung,<sup>70, 197</sup> auch wenn die LDF nur Relativ-, keine Absolutwerte liefert. Bei der Entscheidung für die Laser - Doppler - Fluxmetrie war für uns vor allem die geringe Invasivität und die Möglichkeit, über einen längeren Zeitraum zuverlässig zu messen, wichtig. Der Fokus der vorliegenden Studie liegt auf den Veränderungen der Durchblutung nach Trauma; deswegen sind Relativwerte für den CBF (vor vs. nach Trauma) für die Beantwortung der Fragestellung ausreichend, Absolutwerte der Durchblutung würden die Aussagekraft nur unwesentlich steigern und einen hohen Mehraufwand (z. B. Anschaffung eines Kleintier - Kernspintomographen) erfordern. In vorhergehenden Untersuchungen in unserer Arbeitsgruppe<sup>394</sup> konnte mit der Autoradiographie gezeigt werden, dass sofort nach Trauma die zerebrale Durchblutung im Core – Bereich der Kontusion fast vollständig zum Erliegen kommt, während sie in läsionsfernen Regionen zunächst nur wenig beeinflusst wird. Posttraumatische Veränderungen spielen sich hauptsächlich im Penumbra – Bereich (im Gebiet der A. cerebri media beidseits) ab. Eine lokale Messung mit der LDF über diesem Gebiet spiegelt die Durchblutungsverhältnisse also angemessen wider.

Deswegen erschien unter Abwägung aller Vor - und Nachteile die Laser - Doppler - Fluxmetrie die für uns angemessenste Methode zur Quantifizierung der zerebralen Durchblutung.

### 4.1.3 Durchführung der NO - Inhalation

Die Durchführung einer Langzeit - NO - Inhalation bei Mäusen ist technisch schwierig. Da eine Einzel - Maskenbeatmung, wie sie beim wachen Schwein oder Schaf durchgeführt wird,<sup>12, 12</sup> nicht möglich war, entschieden wir uns für eine Beimengung des Stickstoffmonoxid - Gases zur normalen Atemluft. Dadurch können mehrere Tiere unter exakt gleichen Versuchsbedingungen für längere Zeit behandelt werden. Eine NO<sub>2</sub> - Ablagerung im Fell und eine anschließende orale Aufnahme der Substanz bei der Fellpflege ist jedoch dabei nicht auszuschließen (Mündliche Mitteilung von R. Petersen, Direktor Abteilung Forschung & Entwicklung, Linde Gas). In unseren Untersuchungen zur Toxizität bzw. zu den Nebenwirkungen der NO - Inhalation (siehe 4.2.4) zeigte sich aber kein Hinweis auf eine gesteigerte NO<sub>2</sub> - Toxizität.

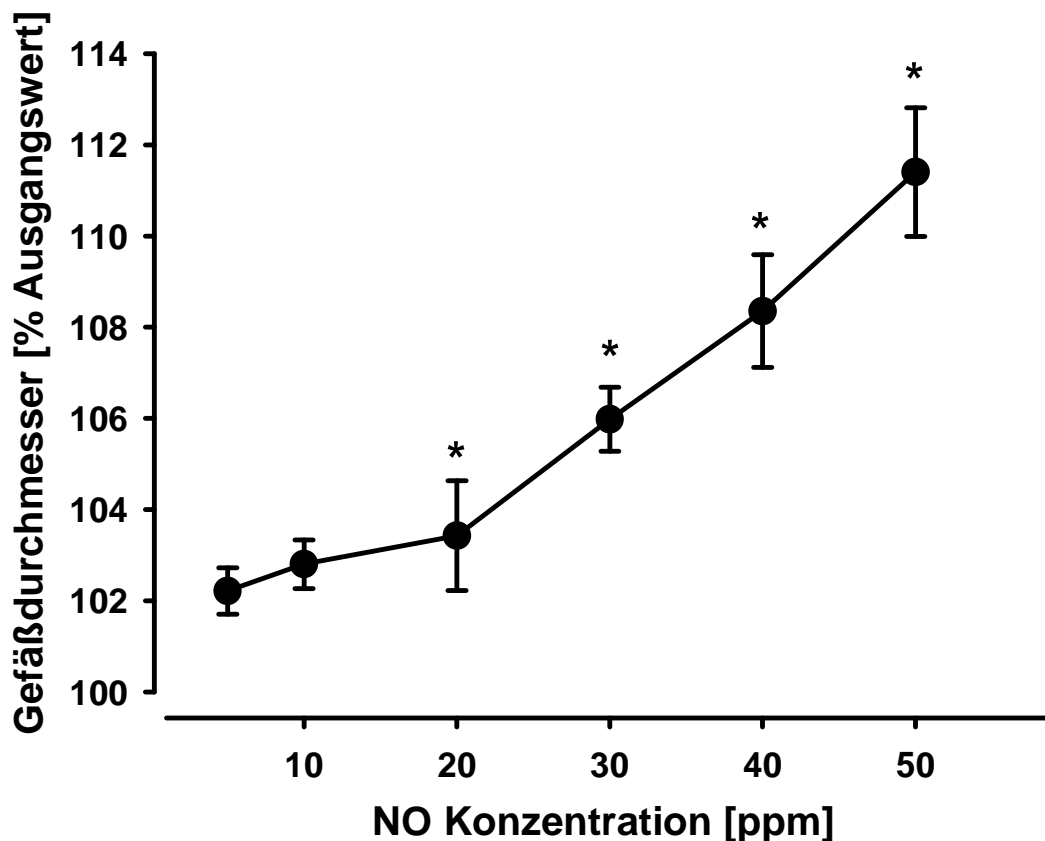


Abbildung 35. Die durch iNO induzierte Vasodilatation zerebraler Venen ist dosisabhängig

In tierexperimentellen Studien wird eine große Bandbreite an NO - Konzentrationen von 2 bis mehreren hundert ppm verwendet; die aktuell empfohlenen Werte für den Menschen liegen momentan bei einer Einstiegsdosis von 20 ppm bis maximal 40 ppm.<sup>109</sup> Bei Neugeborenen sind auch Niedrigstdosis - Therapie - Schemata (2-5



ppm) in Verwendung. Bei der Wahl der Dosis für unsere Versuche orientierten wir uns an den zu Beginn der Studie (2001) gültigen Empfehlungen für Erwachsene, die zu diesem Zeitpunkt zwischen 20 und 80 ppm rangierten. In einer Vorstudie zeigte sich in unserem Mausmodell in der Intravitalmikroskopie bei Dosen von 10 bis 50 ppm eine deutliche Dosisabhängigkeit des NO - Effekts, wobei die stärkste Vasodilatation bei einer Dosierung von 50 ppm auftrat (Abbildung 35).

## 4.2 Diskussion der Ergebnisse

### 4.2.1 Wirkungsmechanismus inhalierten Stickstoffmonoxids

NO führt über eine Aktivierung der löslichen Guanylatzyklase zur Bildung von GMP und dadurch über mehrere Schritte zur Relaxation der Muskelzelle, eine genaue Darstellung des Mechanismus erfolgt in Abbildung 36.

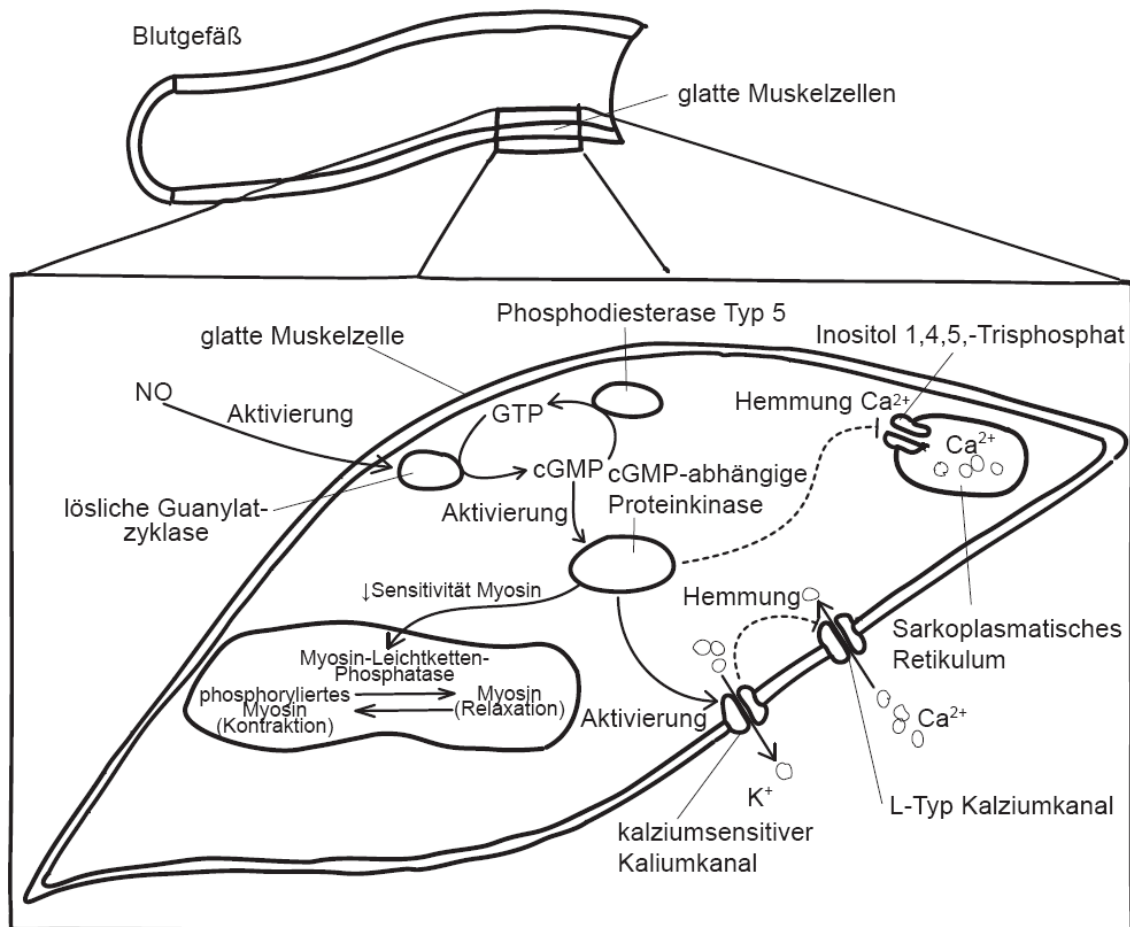


Abbildung 36.: Wirkungsweise von NO in der Endothelzelle.

NO diffundiert in die Zelle und aktiviert dort die lösliche Guanylatzyklase (soluble guanylyl cyclase); dies führt zur Produktion von zyklischem Guanosin-Mono-Phosphat (GMP), was die cGMP sensitive Proteinkinase (PKI) aktiviert. Diese senkt die intrazelluläre Kalzium-Konzentration durch Hemmung der Ca<sub>2</sub><sup>+</sup> - Freisetzung aus dem sarkoplasmatischen Retikulum und durch Aktivierung der kalziumsensitiven Kalium - Kanäle (calcium sensitive potassium channel); dies führt zur Hemmung der Ca<sub>2</sub><sup>+</sup> - Kanäle vom L - Typ). Gleichzeitig senkt die Aktivierung der PKI die Sensitivität von Myosin gegenüber Kalzium. All diese Mechanismen führen zur Relaxation der glatten Muskelzelle.  
modifiziert nach: Griffiths, MJ, Evans, TW *Inhaled nitric oxide therapy in adults*, New England Journal of Medicine, 353, S. 2683-2695, 2005.

Die NO - Inhalation wirkt über denselben Mechanismus: inhaliertes Stickstoffmonoxid diffundiert in die glatten Muskelzellen der Gefäße und aktiviert die Gyanylatzyklase; es kommt zu einem nachweisbaren Anstieg des cGMP - Spiegels im Plasma.<sup>8, 25, 93,</sup>

<sup>94</sup> Eine Hemmung der Guanylatzyklase hebt die iNO - Wirkung auf zerebrale Gefäße auf (Abbildung 7).

Wie bei systemischer Anwendung von NO - Donatoren kommt es auch unter NO - Inhalation zur Zunahme des Gesamt - NO - Gehalts im Plasma (indirekt belegt durch Zunahme der cGMP - Konzentration<sup>8, 93, 94</sup> und des Nitrit/Nitrat - Gehalts<sup>43</sup>), den wir auch in unserem Modell nachweisen konnten: sowohl Nitrosyl - Hämoglobin, das ein Indikator für den Gesamtgehalt an NO ist,<sup>69, 86</sup> als auch der Gehalt an Nitrit und Nitrat (NO<sub>x</sub>), den relativ stabilen Endprodukten des NO - Abbaus,<sup>297</sup> waren unter NO - Inhalation im arteriellen Blut aus der A. carotis signifikant erhöht. Diese Befunde zeigen eindeutig, dass inhaliertes NO nicht selektiv in der Lunge wirkt, sondern auch in die Peripherie transportiert wird.

Wie genau bioaktives NO aus der Lunge in die Peripherie gelangt ist unklar. Es werden zwei prinzipielle Wirkungsmechanismen diskutiert: Weitertransport und Freisetzung von NO durch Hämoglobin und Umwandlung von NO zu Nitrit in der Lunge, das dann peripher wiederum zu NO reduziert wird.

Zunächst wurde eine Bewahrung der NO - Aktivität durch Hämoglobin für sehr unwahrscheinlich erachtet, da die Reaktionskinetik der Hb - NO - Interaktion eher für eine Inaktivierung des NOs sprach: Demnach reagiert NO mit Oxyhämoglobin sofort zu Methämoglobin und Nitrat, das unverändert über die Niere ausgeschieden wird.<sup>77, 78, 143</sup> Mitte der 90er Jahre gelang jedoch der Nachweis von s - nitrosyliertem Hämoglobin (S - Nitroso - Hämoglobin). Hierbei bindet das NO - Molekül an eine Cystin - Seitenkette (93 Cys) der  $\beta$  - Untereinheit des Hämoglobinmoleküls. Diese Bindung erfolgt bevorzugt, wenn Hb im oxygenierten Zustand ist (oxyHb), da im oxygenierten oder R (relaxed) Zustand der Cystein - Rest exponiert wird.<sup>179</sup> Beim Übergang in den T - oder desoxy - Zustand wird die Abgabe des NOs erleichtert, NO wird demnach also bevorzugt in Regionen mit niedrigem pO<sub>2</sub> wieder freigesetzt.<sup>29, 116, 124, 179, 335</sup> Außerdem wurde gezeigt, dass S - NO - Hb vasodilatierend wirkt<sup>179, 245, 246, 386</sup> und dass beim Menschen unter physiologischen Bedingungen ein arteriovenöser S - NO - Hb - Gradient vorliegt.<sup>43, 179, 245</sup> Die daraus abgeleitete Hypothese, S - NO - Hb sei sowohl unter physiologischen Bedingungen als auch nach pharmakologischer Zugabe von NO ein wichtiger Mediator der NO - Wirkung und verantwortlich für die Regulation der Gefäßweite, wurde jedoch von anderen Gruppen angezweifelt. Ihr Hauptargument ist, dass S - NO - Hb im Blut in viel zu geringen Mengen vorkomme (unter 10 nM).<sup>291, 292, 294, 317</sup> Darüber hinaus wird das Vorhandensein eines arteriovenösen Gradienten verneint.<sup>118, 292</sup> Außerdem führe die

NO - Inhalation nicht zu einem signifikanten S - NO - Hb - Anstieg,<sup>116</sup> was eine bedeutende Rolle von Hb als Transporter der NO - Bioaktivität ausschließt.<sup>151</sup>

Es sei viel wahrscheinlicher, dass Nitrit ( $\text{NO}_2^-$ ) der Mediator der NO - Wirkung sei. Nitrit ( $\text{NO}_2^-$ ) entsteht aus der Reaktion von NO mit Sauerstoff ( $\text{O}_2$ ). Anders als reines NO reagiert Nitrit nur sehr langsam mit Hb; NO wird also durch diese Reaktion vor der Inaktivierung geschützt. Außerdem ist es im Plasma stabiler als Nitrosothiole wie S - NO - Hb.<sup>118</sup> Es werden mehrere Mechanismen diskutiert, wie Nitrit wieder zu NO reduziert werden kann: Desoxy-Hb kann als Reduktase für Nitrit funktionieren,<sup>114</sup> nach der Formel  $\text{NO}_2^- + \text{Hb-Fe II [Deoxyhämoglobin]} + \text{H}^+ \rightarrow \text{Hb-Fe III [Methämoglobin]} + \text{NO} + \text{OH}^-$ .<sup>78</sup> Bei hohem Sauerstoffpartialdruck hingegen wirkt (Oxy)Hämoglobin als Oxidase und wandelt Nitrit in Nitrat um, was die NO - Reaktivität zerstört.<sup>78</sup> Die NO - Freisetzung würde durch diese Reaktion bei niedrigem  $\text{pO}_2$  begünstigt.

Darüberhinaus kann Nitrit unter hypoxämischen Bedingungen auch enzymatisch oder nichtenzymatisch reduziert werden.

Die Xanthin - Oxidoreduktase spielt eine Schlüsselrolle im Purin - Abbau und ist gut untersucht.<sup>138, 139</sup> Unter ischämischen Bedingungen, wenn die NO - Synthese - Aktivität abnimmt bzw. niedrig ist, kann die Xanthin - Oxidoreduktase Nitrit zu NO reduzieren.<sup>75, 120, 391</sup>

Im Herz kann bei einem Infarkt NO auch nichtenzymatisch aus Nitrit freigesetzt werden;<sup>398</sup> dieser Mechanismus wird immer wichtiger, je eingeschränkter die Durchblutung ist, d.h. je niedriger der  $\text{pO}_2$  und der pH sind.<sup>397, 398</sup> Den genauen Reaktionsweg beschreibt Zweier.<sup>396</sup>

Es gibt Hinweise, dass Nitrit die endogene NO - Wirkung vermittelt: Unter physiologischen Bedingungen zeigte sich ein arteriovenöser Gradient im Blut,<sup>56, 387</sup> der sich bei Belastung erhöht.<sup>117</sup> Nitrit dilatiert Gefäße in vitro;<sup>131, 172, 216, 242, 262</sup> außerdem führte Nitritinfusion bei gesunden Probanden zu einer Steigerung der Durchblutung.<sup>59</sup> Dies konnte jedoch von anderen Gruppen nicht bestätigt werden;<sup>215</sup> Nitrit wirkte nur in weit suprphysiologischen Dosen vasodilatatorisch.<sup>68</sup> Unter NO - Inhalation kommt es zu einem signifikanten Anstieg der Nitritkonzentration im Blut.<sup>43</sup> Es herrscht jedoch Uneinigkeit darüber, ob ein arteriovenöser Gradient vorhanden ist<sup>43</sup> oder nicht. Deswegen bleibt unklar, ob Nitrit Mediator der iNO - Wirkung ist, also bei der Passage durch die Kapillarnetze verbraucht wird, oder nicht. Außerdem schwanken die Angaben der  $\text{NO}_2^-$  - Konzentration im humanen Plasma stark (150 – 31.000 nM).<sup>117, 235, 292</sup> Wie beim S - NO - Hb ist auch hier das

Problem, dass es verschiedene Messmethoden gibt, die zum Teil unzureichend validiert oder nicht sensitiv genug sind.

Es werden weitere Mechanismen des NO - Weitertransports im Blut diskutiert. Neben Hämoglobin wurden auch s - nitrosylierte Plasmaproteine im Blut von Menschen nachgewiesen.<sup>337</sup> Dabei werden niedrigmolekulare (low molecular weight, LMW) Thiole (S - Nitrocystein, S - Nitrosoglutathion<sup>294</sup>) und hochmolekulare (high molecular weight, HMW) Proteine (hauptsächlich S - Nitroso - Albumin)<sup>334, 337</sup> unterschieden. Über Zwischenschritte sollen diese das NO - Molekül entweder auf Hb übertragen, Nitrit bilden oder direkt freisetzen. Es wird jedoch angezweifelt, dass die Nitrosothiole bei der NO - Inhalation eine wichtige Transporterrolle haben, da unter iNO kein Anstieg von HMW und LMW festzustellen war.<sup>43, 116</sup>

Es wurde mehrfach nachgewiesen, dass NO - Aktivität und Produktion abhängig vom Sauerstoffpartialdruck sind.<sup>192</sup> Darüber hinaus wird die vasodilatatorische Wirkung von Nitrit und NO - Donatoren durch Hypoxie und Azidose verstärkt.<sup>5, 258</sup> Die von uns erstmalig beschriebene zerebrovaskuläre Wirkung von iNO in hypoxämischen Gehirnregionen unterstützt ebenfalls die These, dass die NO - Inhalations - Wirkung bevorzugt bei niedrigem Sauerstoffpartialdruck auftritt. Die Tatsache, dass die von iNO ausgelöste Vasodilatation (und somit Perfusionsverbesserung) selektiv in hypoxämischen Milieu auftritt (physiologisch: in Venen, nach fokaler zerebraler Ischämie: in Arterien und Venen), ließ auf eine Abhängigkeit der NO - Freisetzung vom Sauerstoffpartialdruck schließen. Deswegen konzentriert sich die vorliegende Studie auf die Untersuchung von Nitrit und S - NO - Hb: Wie oben erwähnt gibt es deutliche Hinweise, dass beim NO - Transport durch diese beiden Moleküle NO - Transport und - Abgabe sauerstoffpartialdruckabhängig sind, also die NO - Freisetzung bevorzugt unter Hypoxämie stattfindet.

In der vorliegenden Studie zeigte sich unter NO - Inhalation ein Anstieg sowohl der Nitrit - also auch der S - Nitroso - Hämoglobin - Konzentration auf das Doppelte der Normalwerte. Dies läßt darauf schließen, dass beide Mechanismen an der zerebrovaskulären Wirkung der NO - Inhalation beteiligt sein könnten. Nitrit ist jedoch in 50 - fach höherer Konzentration vorhanden als S - NO - Hb (4 nM gegen über 200 nM), sodass dieser Reaktionsweg zumindest in unserem Versuchsaufbau größeres Gewicht zu haben scheint; diese Hypothese steht im Einklang mit den Daten anderer Untersucher. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass S - NO - Hb ein Zwischenprodukt bei der NO - Freisetzung aus Nitrit ist.<sup>43, 114, 116</sup>

Zusammenfassend kann man sagen, dass der genaue Wirkmechanismus inhalierten Stickstoffmonoxids immer noch nicht vollständig aufgeklärt und Gegenstand unzähliger Studien ist. Die Genauigkeit und Zuverlässigkeit der Messmethoden für NO - Addukte im Blut (auch die von uns verwendete Trijodid - Chemiluminiszenz) sind ebenfalls umstritten.<sup>115, 141, 235</sup> Um den genauen Wirkmechanismus der zerebrovaskulären Wirkung der NO - Inhalation unzweifelhaft aufzuklären sind weitere Studien notwendig.

#### **4.2.2 Wirkung der NO – Inhalation auf den sekundären Hirnschaden**

Normalerweise erhält das Gehirn 15% des Herzminutenvolumens, also zirka 50 ml pro 100 Gramm Hirngewebe und Minute. Im Zuge der Durchführung von Karotisendartherektomien wurde schon in den frühen 1970er Jahren durch temporäre Karotis - Abklemmung gezeigt, dass die elektrische Aktivität im EEG erlischt, wenn die zerebrale Durchblutung um 70% auf Werte um die 15 ml/ 100 g x min fällt.<sup>349, 364</sup> Die Gruppe um Symond dokumentierte in den darauf folgenden Jahren in einem Schlaganfall - Modell für Primaten, dass die Funktion von Neuronen ab einem CBF von 40% des Normalwerts (ca. 50 ml/ 100g x min), d.h. 22 ml/ 100 g x min, gestört bzw. aufgehoben ist, eine Desintegration der Zellmembran – und somit der irreversible Zelltod – jedoch erst bei Werten unter 8 ml/ 100 g x min auftritt.<sup>13, 14</sup> Ist die zerebrale Durchblutung auf ischämische Werte, also unter 22 ml/ 100 g x min, abgesunken, jedoch noch ausreichend für den Strukturhalt der Zelle (also über 8 ml/ 100 g x min), kann die Zellfunktion durch prompte Reperfusion wiederhergestellt werden. Diese Zellen würden also durch Wiederherstellung der Durchblutung vor dem Zelltod „gerettet“.<sup>214</sup> Hirnregionen, in denen nach Schlaganfall diese Verhältnisse herrschen, bezeichnet man als „Penumbra“ (lat. Halbschatten); im Gegensatz zum Kernbereich des Infarkt, in dem der CBF so niedrig ist, dass die Zellen fast sofort nach Beginn der Ischämie absterben, ist das Parenchym in der Penumbra potentiell rettbar. Nach Schädelhirntrauma kommt es ebenfalls zu einem Abfall der zerebralen Durchblutung,<sup>31, 32, 34, 34, 237</sup> besonders um einen Kontusionsherd herum.<sup>105, 318</sup> Analog zum ischämischen Schlaganfall wird das kritisch durchblutete Hirnareal um die Kontusion herum als „traumatische Penumbra“ bezeichnet.<sup>252</sup> Im Gebiet der eigentlichen Kontusion oder Primärläsion, die durch den Aufprall im Moment des Traumas verursacht wird, ist wie im „Core“ - Bereich eines ischämischen Schlaganfalls die Durchblutung so niedrig, dass

die Neuronen mehr oder weniger sofort absterben. Unbehandelt sinkt der CBF im perikontusionellen Hirnparenchym weiter ab, sodass das umgebende Hirngewebe verzögert abstirbt, die Nekrose breitet sich in den ersten 24 bis 48 Stunden nach Trauma konzentrisch um die Primärläsion aus.

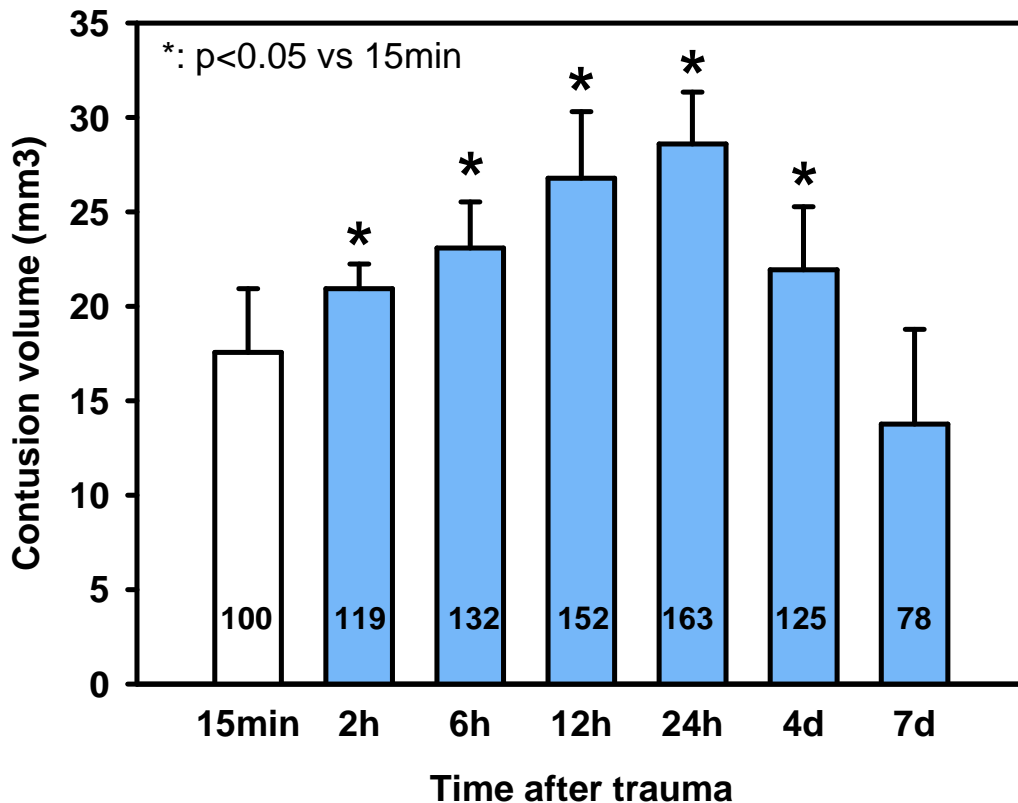


Abbildung 37. Sekundäres Nekrosewachstum im CCI - Modell der Maus. Direkt nach SHT (15 min) zeigt sich der Primärschaden, der allein durch die physikalischen Eigenschaften der Krafteinwirkung beim Trauma bestimmt wird und deswegen therapeutisch nicht beeinflusst werden kann. Schon nach 2h zeigt sich eine deutliche Größenzunahme der Läsion, die zum Zeitpunkt 24h ihr Maximum erreicht; die ursprüngliche Nekrose ist um über 60 % ihrer Ursprungsgröße angewachsen. Im weiteren Verlauf nimmt das Nekrosevolumen aufgrund von Schrumpfungsprozessen und Glia -Narbenbildung wieder ab. aus: Zweckberger, K. Einfluss der Entlastungskraniontomie und des Kallikrein - Kinin Systems auf den sekundären Hirnschaden nach experimentellen Schädelhirntrauma, Dissertation zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin, LMU München, 2006

Dieses Phänomen wird als sekundäres Nekrosewachstum bezeichnet. Es führt zum sekundären Hirnschaden und lässt sich im experimentellen Tiermodell (Abbildung 37) und bei Schädelhirntraumapatienten (Abbildung 38) nachweisen. In der Pathophysiologie des sekundären Nekrosewachstums nimmt der posttraumatische Durchblutungsabfall eine zentrale Rolle ein: Die posttraumatische zerebrale Ischämie führt zur Zellschwellung, dem sogenannten zytotoxischen Ödem. Da auch Astrozyten, deren Fortsätze die zerebralen Gefäße gegen das Parenchym abdichten (und somit

die Blut - Hirn - Schranke bilden), untergehen, kommt es darüberhinaus zur gesteigerten Permeabilität der Blut - Hirn - Schranke. Dem osmotischen Gradienten folgend verursacht dies eine Extravasation von Blutbestandteilen ins umgebende Gewebe.

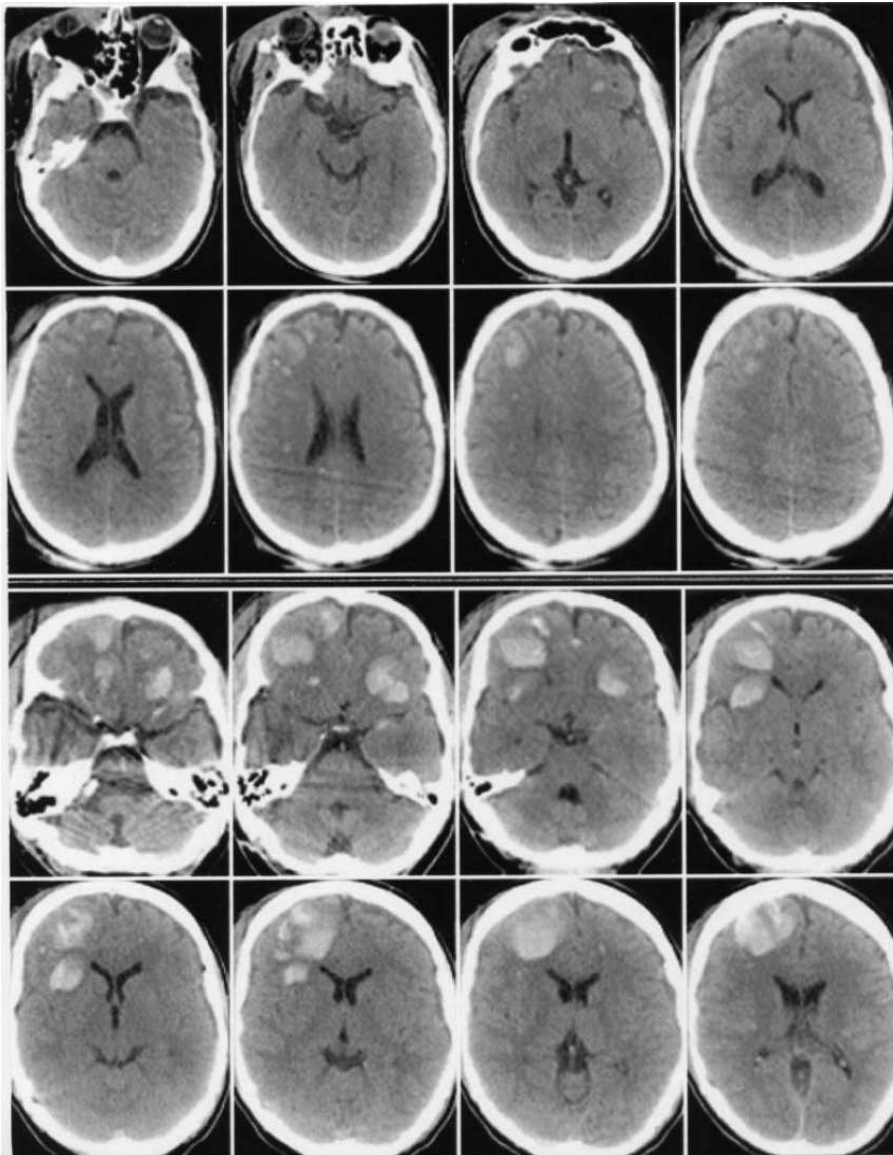


Abbildung 38: Sekundäres Nekrosewachstum beim Menschen. Die oberen zwei Bildreihen zeigen die Computertomographie eines 22jährigen Mannes kurz nach Schädelhirntrauma (Zustand nach Motorradunfall). Im unteren Teil der Abbildung ein weiteres CT desselben Patienten 13 Stunden nach dem Unfall. Man erkennt eine deutliche Größenzunahme der frontalen Kontusionsherde.

aus Lobato RD et. al.(2005) [Value of serial CT scanning and intracranial pressure monitoring for detecting new intracranial mass effect in severe head injury patients showing lesions type I-II in the initial CT scan]. Neurocirugia (Astur.) 16:217-234

Dies führt wie bereits erwähnt zu einem Anstieg des intrakraniellen Volumens. Wie schon *Monro* (1783)<sup>261</sup> und *Kellie* (1824)<sup>187</sup> erkannt haben, ist der Schädel ein geschlossenes System mit den drei Kompartimenten Hirnparenchym, Liquor



cerebrospinalis und Blut. Steigt das Volumen eines der drei Kompartimente, werden zunächst die anderen beiden Kompartimente verdrängt; sind diese Reserven aufgebraucht, kommt es zum Anstieg des intrakraniellen Drucks (Abbildung 39).

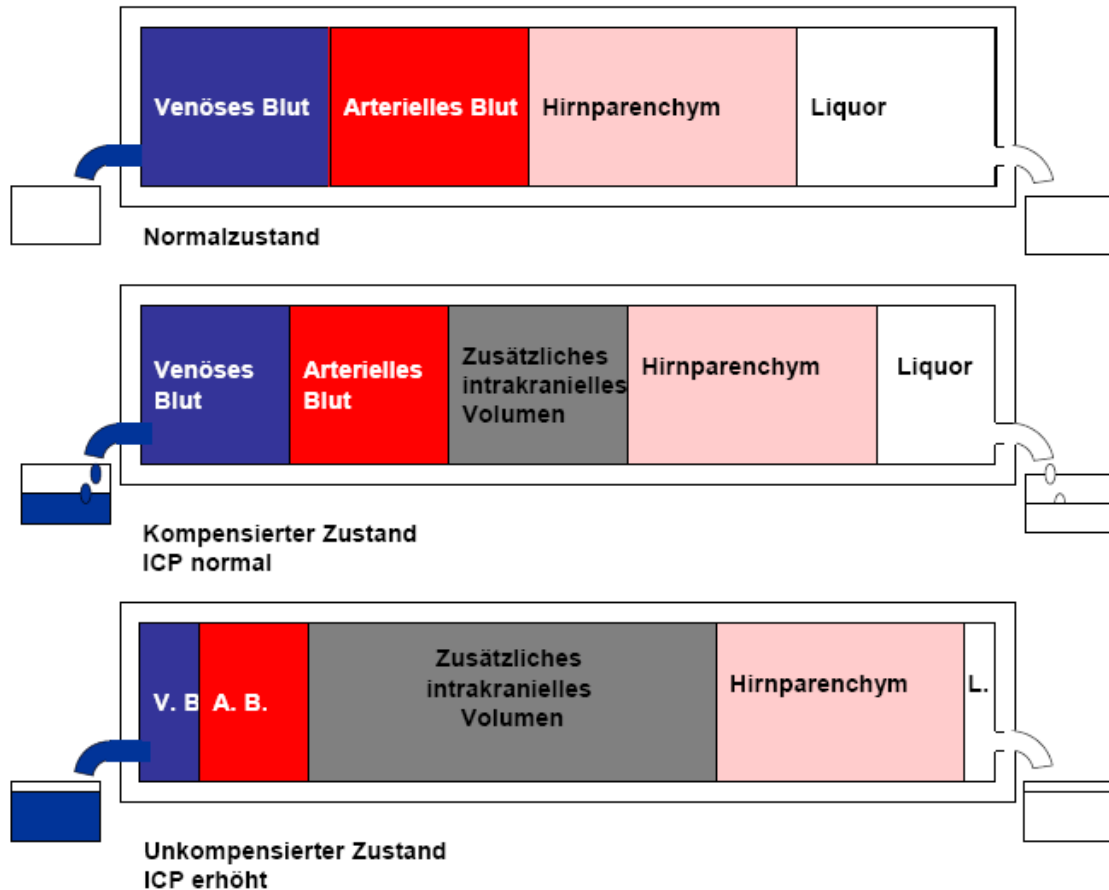


Abbildung 39.

Die Monro - Kellie - Doktrin: Kompensation intrazerebraler Raumforderungen.

Oben: Im normalen Zustand gibt es in der starren Schädelkalotte drei Kompartimente, Blut (arteriell/venös), Gehirnparenchym und Liquor cerebrospinalis.

Mitte: Kommt es nun zu einer intrakraniellen Volumenvermehrung, kann diese Massenzunahme zunächst durch Verdrängung von venösem Blut und Liquor ausgeglichen werden, der intrakranielle Druck bleibt gleich.

Unten: Ab einer kritischen Volumenzunahme (je nach Quelle 80 – 150 ml) kann nicht mehr kompensiert werden, es kommt zur Erhöhung des ICP.

Die posttraumatische intrakranielle Hypertension verstärkt die Minderdurchblutung des Gehirns, da der zerebrale Perfusionsdruck (CPP) bei gleich bleibendem oder sogar erniedrigtem systemischen Blutdruck abfällt. Zusätzlich kommt es zu einer venösen Stauung mit Zunahme des zerebralen Blutvolumens, da die wandschwachen zerebralen Venen durch die Parenchymschwellung komprimiert werden und somit der venöse Abfluss behindert wird, was den CPP zusätzlich vermindert. Die posttraumatische zerebrale Ischämie unterhält bzw. verstärkt sich

selbst in den ersten Stunden und Tagen nach Schädelhirntrauma und führt somit zu einem graduellen Anwachsen der Nekrose, sodass man von einer Art „Circulus vitiosus“ sprechen kann (Abbildung 40).

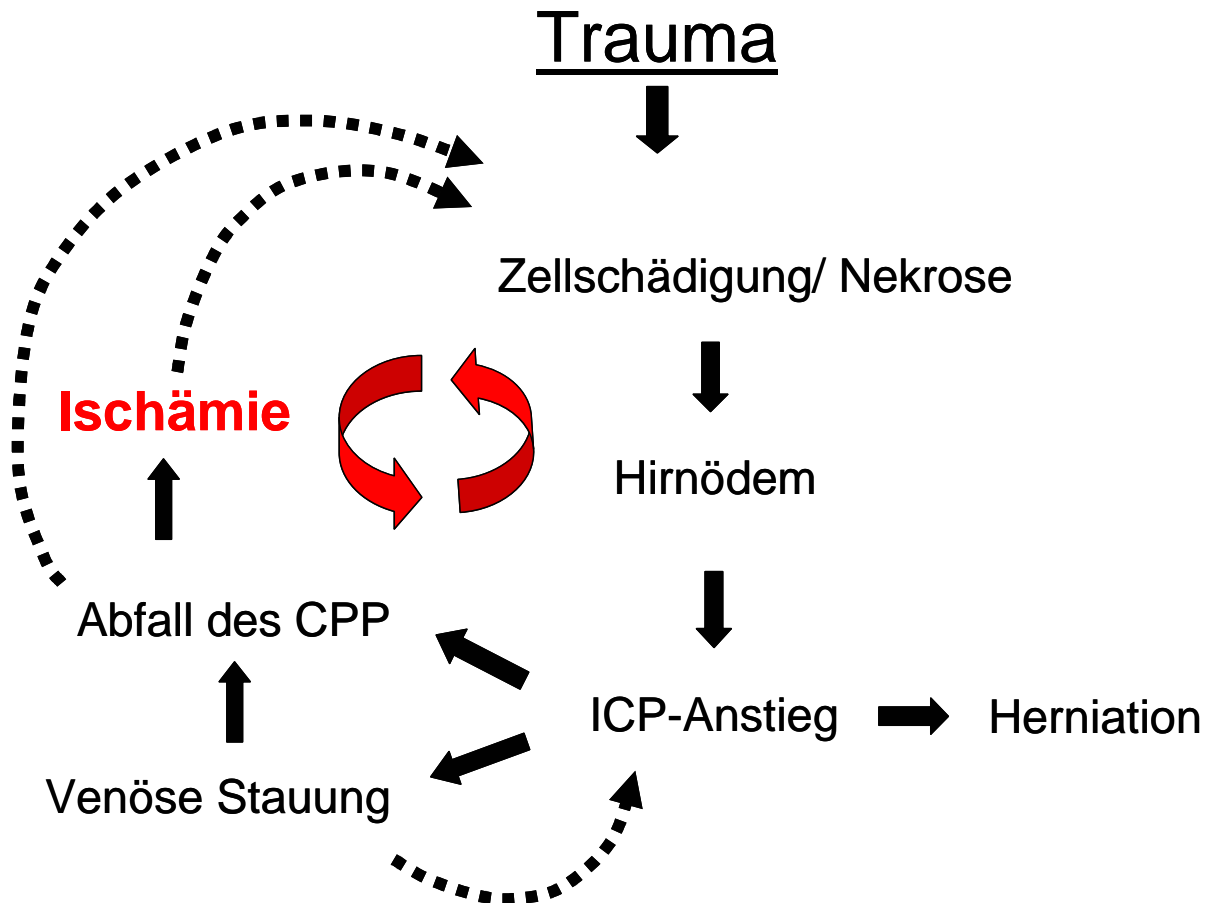


Abbildung 40: Der „Circulus vitiosus“ des sekundären Hirnschadens nach Schädelhirntrauma.

Es ist zudem bekannt, dass zerebrale Ischämie die NO - Konzentration<sup>272, 285, 348, 368</sup> und die NOS - Aktivität vermindert.<sup>192, 295</sup>

Das nach experimentellem Schädelhirntrauma auftretende NO - Defizit ist also teilweise ischämiebedingt. Zunächst zeigt sich ein Sekunden bis mehrere Minuten andauernder starker Anstieg der NO - Konzentration (auf das Zehnfache des Ursprungswerts), danach fällt sie stark ab und bleibt bis mehrere Tage nach Trauma supprimiert.<sup>47, 47, 49, 149, 313, 374</sup> Dies korreliert mit der Aktivität der konstitutiven NO –

Synthesen nach SHT: Zunächst zeigt sich ein starker Anstieg, danach fällt die cNOS - Aktivität jedoch stark ab und bleibt für bis zu sieben Tage supprimiert.<sup>374</sup> Ein Grund für diese NOS - Aktivierung sofort nach SHT könnte ein traumatisch bedingter, kurz dauernder Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration<sup>306, 307</sup> sein, der unter anderem durch den posttraumatischen massiven Anstieg des extrazellulären Kaliums

verursacht wird.<sup>44, 182, 213</sup> Die spätere cNOS - Hemmung wird wahrscheinlich durch Polyamine, wie sie nach SHT im Gehirn auftreten können,<sup>142</sup> mitverursacht.<sup>154</sup>

Es gibt klare Hinweise, dass das Auffüllen des posttraumatischen NO - Defizits die sekundären pathophysiologischen Vorgänge nach Schädelhirntrauma positiv beeinflusst.

Topische und systemische Gabe von L - Arginin, dem direkten Vorläufer von Stickstoffmonoxid, verbessert signifikant die zerebrale Durchblutung,<sup>46, 49, 226</sup> mindert die intrakranielle Hypertension<sup>46, 49, 226</sup> und verringert das Kontusionsvolumen,<sup>150, 374</sup> aber nicht die Zahl nekrotischer Neurone.<sup>49</sup> Beim Menschen ist die systemische Gabe von L - Arginin nach Schädelhirntrauma jedoch risikoreich, da sie den pH - Wert senken<sup>296</sup> und systemische Hypotension auslösen kann.<sup>148, 249</sup> Somit würde man eine besonders bei intrakranieller Hypertension gefährliche weitere Verringerung des zerebralen Perfusionsdrucks riskieren.

Ein weiteres Phänomen, das die Durchblutung der Penumbra zusätzlich verschlechtern kann, ist der so genannte „Steal - Effekt“: Die Gefäße der Penumbra sprechen vermindert auf vasodilatatorische Stimuli wie Hyperkapnie an, während die Vasomotorik von Gefäßen intakter Hirnareale voll funktionstüchtig ist. Dadurch kommt es zu einer Umverteilung des zerebralen Bluts zu Gunsten des gesunden Parenchyms, sodass die Durchblutung im ohnehin schon kritisch durchbluteten perikontusionellen Gebiet weiter abfällt.<sup>156, 350</sup>

Somit ist bei einer systemischen Therapie mit NO - Donatoren mit einer Verschlechterung der posttraumatischen Ischämie, vor allem in der Penumbra, und somit mit einer Verstärkung des sekundären Nekrosewachstums zu rechnen. Inhaliertes NO hat im Gegensatz dazu keinen Einfluss auf gesunde, normal perfundierte Gefäße und beeinflusst den systemischen Blutdruck nicht.<sup>25, 43, 130, 147, 173, 210, 279, 302, 303</sup>

Wir konnten beim experimentellen ischämischen Schlaganfall zeigen, dass iNO selektiv in minderperfundierten Gehirnarealen freigesetzt wird und dort zu einer arteriellen Vasodilatation führt, also im Sinne eines „umgekehrten Steal - Phänomens“ selektiv die Durchblutung in der Penumbra - Region des Schlaganfalls verbessert. In der vorliegenden Studie zeigen wir, dass die NO - Inhalation nach experimentellem Schädelhirntrauma ohne Nebenwirkungen auf den systemischen Blutdruck zu einer signifikanten Verbesserung der zerebralen Durchblutung führt. Gleichzeitig zeigt sich ein signifikant geringerer posttraumatischer

Hirndruckanstieg. Dieser steht mit einer Reduktion des posttraumatischen Hirnödems (gemessen zum Zeitpunkt 24h nach Trauma) in Einklang.

Von Studien bei fokaler zerebraler Ischämie ist bekannt, dass das Ausmaß des (zytotoxischen) Hirnödems proportional zu Länge und Ausmaß der Ischämie ist.<sup>362</sup> Die Hauptursachen der Ödemformation nach Schädelhirntrauma sind eine Störung des Ionentransports und -gleichgewichts sowie eine Depletion der zellulären Energiereserven aufgrund von ATP - Mangel oder gestörtem ATP - Transport.<sup>343, 369</sup> Beides wird durch die posttraumatische Ischämie verursacht,<sup>182, 184, 326</sup> außerdem konnte gezeigt werden, dass eine sekundäre Verschlechterung der zerebralen Durchblutung die Wiederherstellung der Ionengradienten erschwert bzw. verhindert und den posttraumatischen neuronalen Zelltod fördert.<sup>178, 185, 198, 342</sup> Eine Verbesserung der zerebralen Durchblutung durch iNO bekämpft das Entstehen des posttraumatischen Hirnödems und den dadurch verursachten Hirndruckanstieg also kausal.

Neben einer Verminderung des zytotoxischen Hirnödems wirkt inhaliertes NO wahrscheinlich auch auf die vasogene Komponente der Ödems positiv. Es wurde beschrieben, dass NOS - Hemmung die Gefäßpermeabilität steigert;<sup>83, 273</sup> unter NO - Inhalation zeigte sich zudem in Lunge<sup>23</sup> und Mesenterium<sup>91</sup> bei Ischämie – Reperfusionsmodellen eine Verringerung der Gefäßleckage.

Insgesamt wird durch die NO –Inhalation das sekundäre Nekrosewachstum akut an einer zentralen Stelle gehemmt. Wird diese durchblutungsfördernde Therapie über einen längeren Zeitraum fortgeführt, zeigt sich eine signifikante Neuroprotektion: das Nekrosevolumen ist unter iNO - Therapie um 30% reduziert, wenn innerhalb der ersten 60 Minuten nach Trauma mit der Inhalation begonnen wird. Aus der Schlaganfall - Therapie weiß man, dass eine Reperfusion - Therapie nur ein kurzes Zeitfenster hat (bis zu drei Stunden).<sup>133, 134</sup> Dies zeigte sich auch bei der iNO - Therapie nach transienter und permanenter zerebraler Ischämie. Auch beim Schädelhirntrauma scheinen zwei oder drei Stunden nach Trauma die Kaskaden des sekundären Nekrosewachstums bzw. der Durchblutungsabfall in der Penumbra schon so weit fortgeschritten zu sein, dass eine Verbesserung der zerebralen Durchblutung keine entscheidende Neuroprotektion mehr bewirkt. Dies wird durch unsere Untersuchungen zur Dekompressionskraniektomie<sup>394, 395</sup> bestätigt: Durch eine groß angelegte Kraniotomie kann der posttraumatische Durchblutungsabfall und

ICP – Anstieg vollständig verhindert werden, jedoch nur, wenn sie früh nach Trauma durchgeführt wurde.

Außerdem war die NO – Inhalation nur dann deutlich neuroprotektiv, wenn sie bis zum Ende des Beobachtungszeitraums (24h) durchgeführt wurde.

### **4.2.3 Intermittierende NO - Inhalation**

Eine Schwierigkeit der Therapie mit (systemisch angewandten) Nitraten ist die schnelle Ausbildung einer Toleranz („Nitrattoleranz“).<sup>280, 390</sup> Eine Abschwächung der Nitratwirkung findet schon innerhalb von 24 Stunden statt<sup>281</sup> (wahrscheinlich wird eine endotheliale Dysfunktion induziert<sup>27</sup>), weswegen von einer Dauertherapie abgeraten und ein nitratfreies Intervall empfohlen wird.<sup>230</sup> Dieser Wirkungsverlust bei längerfristiger Anwendung scheint bei der NO - Inhalation nicht aufzutreten, sie konnte bis zu 53 Tage durchgeführt werden, ohne dass die positive Wirkung nachließ.<sup>307</sup> Die NO - Konzentration kann bei langfristiger Therapiedauer bei gleich bleibendem Ergebnis sogar reduziert werden.<sup>302</sup>

In der vorliegenden Studie wurde durch intermittierende iNO - Anwendung keine Verringerung der Nekrosevolumens erzielt. Die Einhaltung iNO - freier Intervalle scheint gegenüber der kontinuierlichen Therapie keine Vorteile zu bringen, was mit den bisherigen Erfahrungen mit der NO - Inhalation in Einklang steht (s.o.). Es scheint im Gegenteil sogar so zu sein, dass iNO über den gesamten Zeitraum des sekundären Nekrosewachstums (das sein Maximum im Mausmodell nach 24 Stunden erreicht, sich beim Menschen aber über mehrere Tage hinziehen kann) durchgeführt werden muss. Wurde die NO - Inhalation in unserer Studie nur bis zum Zeitpunkt 12 oder 18 Stunden nach Trauma angewendet, zeigte sich nur eine trendmäßige, keine signifikante Reduktion des Nekrosevolumens, was darauf hindeutet, dass die pathophysiologischen Kaskaden zunächst nur angehalten, nicht aber völlig gestoppt werden.

### **4.2.4 Nebenwirkungen der NO - Inhalation**

Bevor eine mögliche, notwendigerweise also längerfristige Therapie des Schädelhirntraumas mit iNO in Erwägung gezogen werden kann, muss geklärt werden, ob die beobachteten positiven Effekte nicht durch unerwünschte Wirkungen wettgemacht werden.

#### 4.2.4.1 Mittlerer arterieller Blutdruck

Hypotension, besonders in der frühen Phase nach SHT, verschlechtert die Prognose der Patienten deutlich.<sup>20, 51, 236</sup> Außerdem kann es durch systemischen Blutdruckabfall auch schon bei normalem ICP zu zerebraler Mangel-/Minderdurchblutung kommen, was die Mortalität steigert und das Outcome verschlechtert.<sup>32-34, 274</sup> Eine Senkung des systemischen Blutdrucks wurde zwar unter moderaten iNO-Dosen berichtet,<sup>66, 153</sup> erreichte aber nur unter sehr hoher NO – Konzentration (300 ppm) statistische Signifikanz.<sup>66</sup> Die meisten Untersucher sehen jedoch keinen Einfluss der NO - Inhalation auf den mittleren arteriellen Druck.<sup>43, 94, 140, 147, 173, 191, 210, 279, 286, 303, 303</sup> In der vorliegenden Studie fand sich kein Hinweis auf eine blutdrucksenkende Wirkung von 50 ppm iNO. Ganz im Gegenteil zeigte der MAP kurz nach Beginn der NO Inhalation sogar einen Trend zu höheren Werten. Diese paradox anmutende Reaktion wurde auch von anderen Untersuchern berichtet;<sup>371</sup> die genaue Ursache für diesen transienten Anstieg des systemischem Blutdrucks ist jedoch unklar.

#### 4.2.4.2 Einfluss auf die Gerinnung

Da es beim Schädelhirntrauma in einem hohen Prozentsatz der Fälle zu Gefäßzerreißen und Blutungen (intrazerebral, subarachnoidal, subdural, epidural)<sup>251</sup> kommt, ist eine weitere wichtige Frage, ob sich die NO - Inhalation schädlich auf die Gerinnung auswirkt.

Ob und wie inhaliertes NO die Gerinnung beeinflusst, wird seit Jahren kontrovers diskutiert. Es herrscht kein Konsens darüber, ob die Thrombozyten und ihre Funktion beeinträchtigt werden<sup>129, 152, 153, 315</sup> oder nicht.<sup>7, 8, 108, 152, 207</sup> In den aufgezählten Studien werden unterschiedliche Aspekte der Thrombozytenfunktion mit unterschiedlicher Methodik und Gewichtung untersucht, was einen Vergleich erschwert. Außerdem haben die Versuchspersonen teilweise schwere systemische Erkrankungen (z. B. ARDS<sup>315</sup>), die per se eine Beeinträchtigung der Gerinnung verursachen könnten.

Ein weiterer unter iNO häufig geprüfter Parameter ist die Blutungszeit, mit der ebenfalls (global) die Thrombozytenfunktion untersucht wird. Auch hierbei werden divergierende Ergebnisse berichtet: Bei Versuchstieren und bei Menschen fanden sich unter Dosen von 30 – 300 ppm NO Blutungszeitverlängerungen,<sup>108, 152, 153, 190</sup> andere sehen in ähnlich aufgebauten Untersuchungen keinen Effekt.<sup>7, 207, 315</sup> Blutungszeitverlängerungen waren aber schnell reversibel (nach 15 Minuten nicht

mehr signifikant nachweisbar<sup>153</sup>) oder traten erst nach langfristiger NO - Inhalation auf,<sup>8</sup> sodass allgemein davon ausgegangen wird, dass die iNO - Therapie beim hämatologisch gesunden Patienten nicht zu einer Erhöhung des Blutungsrisikos führt. An gesunden Ratten zeigte sich in unserer Studie mit der „Ivy - Nelson“ - Methode kein signifikanter Effekt auf die primäre Blutstillung; alle unter und nach 30 - minütiger NO - Inhalation erhobenen Werte lagen im Normbereich.

#### **4.2.4.3 NO<sub>2</sub> - Gehalt**

Stickstoffmonoxid - Gas ist in Raumlufte instabil und kann Stickstoffdioxid (NO<sub>2</sub>) bilden. NO<sub>2</sub> wirkt in Konzentrationen über 5 ppm auf die Atemwege direkt toxisch und ist eine Komponente der abgasbedingten Luftverschmutzung. NO<sub>2</sub> ist maßgeblich an der Entstehung vieler umweltverschmutzungsbedingter kardiovaskulärer und pulmonaler Erkrankungen beteiligt.<sup>21, 45, 186</sup> Eine geringfügige Entstehung von NO<sub>2</sub> ist bei der NO - Inhalation nicht auszuschließen.<sup>378</sup> Zur Vermeidung relevanter NO<sub>2</sub> - bedingter Nebenwirkungen sollte die iNO - Dosis möglichst gering gehalten werden, was auch in den akutellen Empfehlungen zur NO - Inhalations - Therapie berücksichtigt wird.<sup>110</sup> Bei unseren Langzeit - Experimenten wurde die Stickstoffdioxid - Konzentration laufend gemessen, sie war zu allen Zeitpunkten unter 1 ppm und somit unter dem empfohlenen Grenzwert von 2 ppm.<sup>111</sup>

#### **4.2.4.4 Oxidativer Schaden durch radikale Sauerstoffspezies**

Reagiert endogenes oder systemisch zugeführtes NO mit einem Superoxid - Anion, entsteht Peroxynitrit (ONOO<sup>-</sup>);<sup>204</sup> das über Lipid - Peroxide zu DNA- und mitochondrialen Schäden führen kann. Außerdem ist ONOO<sup>-</sup> wahrscheinlich im Zusammenhang mit NMDA - vermittelten posttraumatischen Schädigungsmechanismen neurotoxisch.<sup>63, 65, 217, 225 225</sup>

Ein anderer bedeutsamer Schädigungsmechanismus des Peroxynitrits führt über die Nitrosylierung von Proteinen.<sup>385</sup> Nitrosylierung ist - ähnlich wie Phosphorylierung - ein wichtiger Prozess zur Zellregulierung, der Funktionen wie Signaltransduktion, DNA - Reparatur - Mechanismen, Blutdruckkontrolle, Ionenkanal - Regulation und Neurotransmission beeinträchtigen kann.<sup>36</sup> Nitrotyrosin - Bildung wurde auch nach Ischämie - Reperfusion<sup>88</sup> berichtet.

Ein vermehrtes Auftreten von Protein - Nitrosylierung fand sich nach längerfristiger (4 Tage)<sup>136</sup> oder hochdosierter (>100 ppm NO)<sup>191</sup> NO - Inhalation. In anderen Studien ergaben sich jedoch auch nach tagelanger iNO - Therapie weder direkte noch

indirekte Hinweise auf erhöhten oxidativen Schaden.<sup>25, 159, 228</sup> In unserem Modell zeigte sich nach 24 - stündiger NO - Inhalation kein vermehrtes Vorkommen von Proteinnitrosylation im Gehirngewebe. Ein Vorkommen von Nitrotyrosin in der Lunge lässt sich jedoch nicht vollständig ausschließen.

ONOO<sup>-</sup> kann jedoch von der Superoxid - Dismutase inaktiviert werden. Diese ist intrazellulär im Überfluss vorhanden, daher ist mit verstärkter Peroxynitrit - Bildung nur bei sehr hoher iNO - Zufuhr zu rechnen.<sup>378</sup>

#### **4.2.4.5 Einfluss auf die endogene NO - Produktion**

Wie bereits erwähnt wird NO endogen durch die NO - Synthasen gebildet; unter physiologischen Bedingungen werden dort hauptsächlich die konstitutiven Isoformen eNOS und nNOS exprimiert, die induzierbare NO - Synthase ist unter Normalbedingungen nur in äußerst geringem Ausmaß nachweisbar. Eine ausführliche Beschreibung von NOS - Funktion, - Struktur und - Regulation bieten Li und Poulos<sup>219</sup> sowie Alderton et al.<sup>9</sup> Die größte Menge an endogenem NO wird vom Endothel gebildet (ca. 400 nM).<sup>26, 367</sup> Unter physiologischen Bedingungen wird viel mehr NO produziert, als für eine Aktivierung der Guanylatzyklase benötigt wird (EC50 20 nM).<sup>22</sup>

Systemische Gabe von NO - Donatoren kann die Aktivität der zerebellären eNOS hemmen.<sup>39</sup> Ob und wie inhaliertes NO die endogene NO - Produktion durch die NOS beeinflusst, ist umstritten. Während einige Untersucher bei moderaten iNO - Dosen (40 ppm) eine signifikante und nach Absetzung anhaltende Suppression der eNOS - Aktivität beobachteten,<sup>25</sup> sahen andere auch nach Langzeitanwendung (bis zu 3 Wochen) keinen Einfluss.<sup>92</sup> In einer weiteren Studie war unter iNO die Aktivität, aber nicht die Expression der endothelialen NO - Synthase vermindert;<sup>321</sup> andere Untersucher wiesen unter iNO - Dosen von über 100 ppm eine Erhöhung der eNOS - Expression nach.<sup>191</sup> In unseren Untersuchungen sahen wir nach einer 24stündigen NO - Inhalationsbehandlung keinen Unterschied in der Expression aller NOS. Dennoch kann eine (kurzfristige) Aktivitätsminderung der Enzyme nicht mit letzter Sicherheit ausgeschlossen werden.

#### **4.2.5 Möglicher Stellenwert der NO - Inhalation in der SHT - Therapie**

Die Internationale Gesellschaft für Neurotraumatologie (International Brain Trauma Society, INTS) gibt regelmäßig revidierte evidenzbasierte Leitlinien über die Behandlung des Schädelhirntraumas heraus



(<http://www2.braintrauma.org/guidelines/index.php>). Nach Sicherstellung der Vitalfunktionen (Vermeidung von Hypotension, ausreichende Oxygenierung, Sedation) liegt der Therapieschwerpunkt in der Vermeidung bzw. Linderung der intrakraniellen Hypertension, um lebensbedrohliche Herniationen zu vermeiden und um einen ausreichenden zerebralen Perfusionsdruck, also über 60 mmHg, zu gewährleisten. Therapiestrategien erster Wahl sind dabei die Ventrikeldrainage, die milde Hyperventilation (pCO<sub>2</sub> von 30 – 35 mmHg) und die hyperosmolare Infusionstherapie mit Mannitol; versagen diese Behandlungsstrategien, können mit weniger evidenzbasierten Therapieregimen (so genannten second tier therapies) wie Barbituratcoma, starker Hyperventilation (unter 30 mmHg pCO<sub>2</sub>) oder durch eine Entlastungskraniotomie versucht werden, den intrazerebralen Druck zu senken. Diese Therapieoptionen sind mit höheren Risiken verbunden: Bei der starken Hyperventilation kann durch übermäßige Vasokonstriktion eine zerebrale Ischämie verschlimmert werden, das Barbituratcoma ist mit starken Medikamentennebenwirkungen behaftet und die Kraniotomie kann den sekundären Hirnschaden zwar sehr wirksam bekämpfen, setzt aber die Operationsfähigkeit des Patienten voraus.

Eine wirksame krankheitsspezifische pharmakologische Therapie des Schädelhirntraumas gibt es bis heute nicht. Obwohl mit einigen Substanzen im Tierversuch vielversprechende Erfolge erzielt wurden, konnte sich bisher keine in klinischen Studien durchsetzen. Einen guten Überblick über aktuelle Therapieansätze und Medikamentenstudien gibt Marklund.<sup>238</sup> Bisher haben jedoch neuroprotektive Strategien weitgehend versagt.<sup>76</sup> Die posttraumatische Ischämie, die eine Schlüsselrolle in der Pathophysiologie des sekundären Nekrosewachstums einnimmt, kann bisher therapeutisch nicht direkt beeinflusst werden. Die NO - Inhalation bietet daher einen komplett neuen Therapieansatz in der SHT - Behandlung: Durch selektive Verbesserung der Durchblutung in ischämischen Arealen des Gehirnparenchyms, die sich vor allem um die Kontusion herum befinden, wird das sekundäre Nekrosewachstum an einer zentralen Stelle gehemmt.

Ein Problem der SHT - Forschung besteht darin, dass bisher die Übertragung des Therapieerfolgs vom Tierversuch auf den Menschen in der Mehrzahl gescheitert ist.<sup>233, 234</sup>

Die Wirksamkeit der iNO - Therapie beim Menschen ist bei pulmonalen und kardialen Erkrankungen unzweifelhaft nachgewiesen. Die klinische Zulassung für reife Neugeborene besteht seit 1999 für die USA und seit 2002 in Europa.

Zerebrovaskuläre Effekte wurden bereits beim Säugetier nachgewiesen.<sup>209</sup>  
Deswegen besteht berechnigte Hoffnung, dass die NO - Inhalation zur Behandlung  
des Schädelhirntraumas erfolgreich sein könnte.

## 5 Zusammenfassung und Ausblick

Das Schädelhirntrauma ist eine schwerwiegende Erkrankung, die häufig jüngere Menschen betrifft, eine hohe Mortalität besitzt und in den übrigen Fällen häufig zu bleibenden neurologischen Schäden bzw. Invalidität führt. Bisher existiert keine kausale Therapie für dieses Krankheitsbild.

In der Pathophysiologie des SHT unterscheidet man den primären Hirnschaden, der durch die eigentliche Gewalteinwirkung zustande kommt und therapeutisch nicht beeinflusst werden kann, von sekundären Traumafolgen: Sofort nach Trauma kommt es zu einem starken Abfall der zerebralen Durchblutung auf ischämische Werte, der eine Kaskade schädigender Mechanismen (Anstieg des intrakraniellen Drucks, Entwicklung eines Hirnödems) auslöst. Dies führt dazu, dass das zunächst noch intakte Hirngewebe um das Gebiet des Primärschadens herum sukzessive abstirbt; dieses Phänomen wird sekundärer Hirnschaden, das Gewebe um die ursprüngliche Läsion herum, das in der posttraumatischen Phase vom Absterben bedroht ist, traumatische Penumbra genannt. Als Modell für das Schädelhirntrauma wurde in unserer Arbeitsgruppe das Controlled - Cortical - Impact Modell der Maus etabliert, das einen hochgradig reproduzierbaren Primärschaden verursacht; die posttraumatischen Vorgänge sind gut untersucht und entsprechen der an Patienten beobachteten Pathophysiologie.

In der vorliegenden experimentellen Studie wird die NO - Inhalation als neue Therapieoption bei Schädelhirntrauma evaluiert. Wie bereits in Vorstudien gezeigt wurde, bewirkt inhalativ verabreichtes Stickstoffmonoxid in minderdurchbluteten Hirnarealen eine selektive Vasodilatation und somit eine Perfusionverbesserung in ischämischem Hirnparenchym ohne den systemischen Gefäßwiderstand zu beeinflussen. Wird dieses Konzept nach experimentellen SHT angewendet, kommt es zu einer Steigerung der Durchblutung in der traumatischen Penumbra. Dem CBF - Abfall nach Trauma (um 30 – 40% des Ausgangswerts, gleich in beiden Gruppen) wird nahezu sofort nach Beginn der NO - Inhalation entgegengewirkt. Anders als bei der Kontrollgruppe kommt im weiteren posttraumatischen Verlauf nicht nur zu keiner weiteren Abnahme der Durchblutung, sondern sogar zu einer langsamen Erholung; nach 90 Minuten zeigten sich annähernd Ausgangswerte, ab 63 Minuten nach Trauma ist die zerebrale Durchblutung der iNO - Tiere signifikant besser als die der Kontrolltiere. Gleichzeitig zeigt sich eine signifikant geringere intrazerebralen Hypertension: während sich in der Kontrollgruppe posttraumatische Werte bis zu  $28,8 \pm 9,7$  mmHg gemessen wurden, fanden sich in der iNO - Gruppe ein maximaler ICP von  $12 \pm 5,6$  mmHg. Dosis - Findungs - und Therapiefenster - Versuchsreihen zeigten, dass die NO - Inhalation auch längerfristig

den sekundären Hirnschaden positiv beeinflusst: Bis zu einer Stunde nach Trauma angewendet kann eine kontinuierlich durchgeführte NO - Inhalation signifikant den posttraumatischen Hirnschaden reduzieren (um 30%), außerdem zeigte sich bei iNO – behandelten Tieren ein signifikant geringer ausgeprägtes Hirnödem. Eine Tachyphylaxie, also eine Wirkungsabschwächung bzw. ein Wirkungsverlust bei längerer Anwendung zeigte sich nicht, im Gegenteil: Die NO - Inhalation führte nur dann zu einer signifikanten Verringerung des sekundären Hirnschadens, wenn sie über den gesamten Zeitraum des sekundären Nekrosewachstums (bei der Maus 24 Stunden) kontinuierlich durchgeführt wurde. In der vorliegenden Studie wurde kein negativer Einfluss auf den systemischen Blutdruck, auf die endogene NO - Produktion und auf die primäre Homöostase festgestellt; eine Zunahme der Produktion freier Sauerstoffradikale wurde ebenfalls nicht nachgewiesen. Auch in früheren Studien fand sich kein Hinweis auf gravierende Nebenwirkungen.

In einem dritten Teil der vorliegenden Arbeit wurde versucht, den Wirkungsmechanismus inhalierten Stickstoffmonoxids genauer zu charakterisieren. Bisher ist unklar, wie eingeatmetes Stickstoffmonoxid aus der Lunge in die Körperperipherie transportiert wird. Es werden mehrere NO - Addukte als Transporter diskutiert, die beste Datenlage existiert für Nitrit ( $\text{NO}_2^-$ ) und S - Nitroso - Hämoglobin (S - NO - Hb). Unter iNO zeigte sich im Blut gesunder Versuchstiere ein signifikanter Anstieg sowohl der  $\text{NO}_2^-$  - als auch der S - NO - Hb - Konzentration auf das Doppelte der physiologischen Werte; beide Stoffe scheinen in der Vermittlung der iNO - Wirkung beteiligt zu sein.

Nach bisherigen Erfahrungen ist iNO nebenwirkungsarm, leicht anzuwenden und fast überall verfügbar. Die für die Durchführung der NO - Inhalation benötigten Geräte sind bereits in klinischem Gebrauch.

Wir konnten bereits zeigen, dass die NO - Inhalation auch bei anderen zerebralen Insulten (ischämischer/ hämorrhagischer Schlaganfall, SAB) wirksam ist.

Die NO - Inhalation könnte also eine einfach anwendbare kausale Therapie des sekundären Hirnschadens nach Schädel-Hirn Trauma. Sie könnte als Therapeutikum in der Notfallversorgung des Schädelhirntraumas zum Einsatz kommen und ohne vorgehende diagnostische Maßnahmen angewendet werden, da sie sich im Falle einer intrakraniellen Blutung oder eines Apoplex ebenfalls als wirksam erwiesen hat; außerdem scheint sie die Homöostase nicht zu beeinträchtigen. Sollte die durchblutungsfördernde und hirndrucksenkende Wirkung der NO - Inhalation zur Behandlung der Folgen eines Schädelhirntraumas nicht ausreichen, gewinnt man außerdem Zeit, um notwendige Maßnahmen wie Bildgebung, die Vorbereitung einer operativen Maßnahme (z.B. Entlastungstrepanation) einzuleiten.

## 6 Referenzen

1. Editorial: Timidity in the use of nitrite of amyl. *Boston Medical Surgery Journal* [105], 597. 1881.
2. Inhaled nitric oxide in full-term and nearly full-term infants with hypoxic respiratory failure. The Neonatal Inhaled Nitric Oxide Study Group. *N.Engl.J.Med.* 336[9], 597-604. 1997.
3. Adams,J.H., Graham,D.I., & Gennarelli,T.A. Head injury in man and experimental animals: neuropathology. *Acta Neurochir.Suppl (Wien.)* 32, 15-30. 1983.
4. Adams,J.H., Scott,G., Parker,L.S., Graham,D.I., & Doyle,D. The contusion index: a quantitative approach to cerebral contusions in head injury. *Neuropathol.Appl.Neurobiol.* 6[4], 319-324. 1980.
5. Agvald,P., Adding,L.C., Artlich,A., Persson,M.G., & Gustafsson,L.E. Mechanisms of nitric oxide generation from nitroglycerin and endogenous sources during hypoxia in vivo. *Br.J.Pharmacol.* 135[2], 373-382. 2002.
6. Akimitsu,T., Gute,D.C., & Korthuis,R.J. Leukocyte adhesion induced by inhibition of nitric oxide production in skeletal muscle. *J.Appl.Physiol* 78[5], 1725-1732. 1995.
7. Albert,J., Norman,M., Wallen,N.H., Frostell,C., & Hjemdahl,P. Inhaled nitric oxide does not influence bleeding time or platelet function in healthy volunteers. *Eur.J.Clin.Invest* 29[11], 953-959. 1999.
8. Albert,J., Wallen,N.H., Broijersen,A., Frostell,C., & Hjemdahl,P. Effects of inhaled nitric oxide compared with aspirin on platelet function in vivo in healthy subjects. *Clin.Sci.(Lond)* 91[2], 225-231. 1996.
9. Alderton,W.K., Cooper,C.E., & Knowles,R.G. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem.J.* 357[Pt 3], 593-615. 2001.
10. Armstead,W.M. Role of endothelin in pial artery vasoconstriction and altered responses to vasopressin after brain injury. *J.Neurosurg.* 85[5], 901-907. 1996.
11. Arnold,W.P., Mittal,C.K., Katsuki,S., & Murad,F. Nitric oxide activates guanylate cyclase and increases guanosine 3':5'-cyclic monophosphate levels in various tissue preparations. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 74[8], 3203-3207. 1977.
12. Ashley,Z., Jugg,B., Brown,R.F., Kenward,C.E., Platt,J., Rice,P., & Harban,F.M. Effects of inhaled nitric oxide on the anesthetized, mechanically ventilated, large white pig. *Inhal.Toxicol.* 14[11], 1175-1185. 2002.
13. Astrup,J., Siesjo,B.K., & Symon,L. Thresholds in cerebral ischemia - the ischemic penumbra. *Stroke* 12[6], 723-725. 1981.
14. Astrup,J., Symon,L., Branston,N.M., & Lassen,N.A. Cortical evoked potential and extracellular K<sup>+</sup> and H<sup>+</sup> at critical levels of brain ischemia. *Stroke* 8[1], 51-57. 1977.
15. Atherton,R. *Electron Spin Resonance: A review of recent literature to 1993.* Royal Society of Chemistry. London . 1993.
16. Atochin,D.N., Demchenko,I.T., Astern,J., Boso,A.E., Piantadosi,C.A., & Huang,P.L. Contributions of endothelial and neuronal nitric oxide synthases to cerebrovascular responses to hyperoxia. *J.Cereb.Blood Flow Metab* 23[10], 1219-1226. 2003.
17. Aukland,K., Bower,B.F., & Berliner,R.W. Measurement of local blood flow with hydrogen gas. *Circ.Res.* 14, 164-187. 1964.
18. Baethmann,A., Wirth,A., & Schlesinger-Raab,A. Prospective system analysis of the pre- and early hospital care in severe head injury in Bavaria at a population-based level. *Eur.Surg.Res.* 34[1-2], 42-46. 2002.
19. Bahrami,K.R. & Van Meurs,K.P. ECMO for neonatal respiratory failure. *Semin.Perinatol.* 29[1], 15-23. 2005.
20. Barton,C.W., Hemphill,J.C., Morabito,D., & Manley,G. A novel method of evaluating the impact of secondary brain insults on functional outcomes in traumatic brain-injured patients. *Acad.Emerg.Med* 12[1], 1-6. 2005.
21. Belanger,K., Gent,J.F., Triche,E.W., Bracken,M.B., & Leaderer,B.P. Association of indoor nitrogen dioxide exposure with respiratory symptoms in children with asthma. *Am.J.Respir.Crit Care Med* 173[3], 297-303. 2006.
22. Bellamy,T.C., Wood,J., Goodwin,D.A., & Garthwaite,J. Rapid desensitization of the nitric oxide receptor, soluble guanylyl cyclase, underlies diversity of cellular cGMP responses. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 97[6], 2928-2933. 2000.

23. Benzing,A., Brautigam,P., Geiger,K., Loop,T., Beyer,U., & Moser,E. Inhaled nitric oxide reduces pulmonary transvascular albumin flux in patients with acute lung injury. *Anesthesiology* 83[6], 1153-1161. 1995.
24. Bindels,A.J., van der Hoeven,J.G., Groeneveld,P.H., Frolich,M., & Meinders,A.E. Atrial natriuretic peptide infusion and nitric oxide inhalation in patients with acute respiratory distress syndrome. *Crit Care* 5[3], 151-157. 2001.
25. Black,S.M., Heidersbach,R.S., McMullan,D.M., Bekker,J.M., Johengen,M.J., & Fineman,J.R. Inhaled nitric oxide inhibits NOS activity in lambs: potential mechanism for rebound pulmonary hypertension. *Am.J.Physiol* 277[5 Pt 2], H1849-H1856. 1999.
26. Blatter,L.A., Taha,Z., Mesaros,S., Shacklock,P.S., Wier,W.G., & Malinski,T. Simultaneous measurements of Ca<sup>2+</sup> and nitric oxide in bradykinin-stimulated vascular endothelial cells. *Circ.Res.* 76[5], 922-924. 1995.
27. Bode-Boger,S.M. & Kojda,G. Organic nitrates in cardiovascular disease. *Cell Mol.Biol.(Noisy-le-grand)* 51[3], 307-320. 2005.
28. Bolotina,V.M., Najibi,S., Palacino,J.J., Pagano,P.J., & Cohen,R.A. Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle. *Nature* 368[6474], 850-853. 1994.
29. Bonaventura,C., Ferruzzi,G., Tesh,S., & Stevens,R.D. Effects of S-nitrosation on oxygen binding by normal and sickle cell hemoglobin. *J.Biol.Chem.* 274[35], 24742-24748. 1999.
30. Borgos,J. Laser Doppler monitoring of cerebral blood flow. *Neurol.Res.* 18[3], 251-255. 1996.
31. Bouma,G.J. & Muizelaar,J.P. Cerebral blood flow, cerebral blood volume, and cerebrovascular reactivity after severe head injury. *J.Neurotrauma* 9 Suppl 1, S333-S348. 1992.
32. Bouma,G.J. & Muizelaar,J.P. Evaluation of regional cerebral blood flow in acute head injury by stable xenon-enhanced computerized tomography. *Acta Neurochir.Suppl (Wien.)* 59, 34-40. 1993.
33. Bouma,G.J., Muizelaar,J.P., Choi,S.C., Newlon,P.G., & Young,H.F. Cerebral circulation and metabolism after severe traumatic brain injury: the elusive role of ischemia. *J.Neurosurg.* 75[5], 685-693. 1991.
34. Bouma,G.J., Muizelaar,J.P., Stringer,W.A., Choi,S.C., Fatouros,P., & Young,H.F. Ultra-early evaluation of regional cerebral blood flow in severely head-injured patients using xenon-enhanced computerized tomography. *J.Neurosurg.* 77[3], 360-368. 1992.
35. Bredt,D.S. & Snyder,S.H. Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 87[2], 682-685. 1990.
36. Broillet,M.C. S-nitrosylation of proteins. *Cell Mol.Life Sci.* 55[8-9], 1036-1042. 1999.
37. Bryan,R.M., Jr., Cherian,L., & Robertson,C. Regional cerebral blood flow after controlled cortical impact injury in rats. *Anesth.Analg.* 80[4], 687-695. 1995.
38. Buchanan,J.E. & Phillis,J.W. The role of nitric oxide in the regulation of cerebral blood flow. *Brain Res.* 610[2], 248-255. 1993.
39. Buga,G.M., Griscavage,J.M., Rogers,N.E., & Ignarro,L.J. Negative feedback regulation of endothelial cell function by nitric oxide. *Circ.Res.* 73[5], 808-812. 1993.
40. Buki,A. & Povlishock,J.T. All roads lead to disconnection?--Traumatic axonal injury revisited. *Acta Neurochir.(Wien.)* 148[2], 181-193. 2006.
41. Bullock,R. Pathophysiological alterations in the central nervous system due to trauma. *Schweiz.Med.Wochenschr.* 123[11], 449-458. 1993.
42. Busse,R. & Mulsch,A. Calcium-dependent nitric oxide synthesis in endothelial cytosol is mediated by calmodulin. *FEBS Lett.* 265[1-2], 133-136. 1990.
43. Cannon,R.O., III, Schechter,A.N., Panza,J.A., Ognibene,F.P., Pease-Fye,M.E., Waclawiw,M.A., Shelhamer,J.H., & Gladwin,M.T. Effects of inhaled nitric oxide on regional blood flow are consistent with intravascular nitric oxide delivery. *J.Clin.Invest* 108[2], 279-287. 2001.
44. Cargill,R.S. & Thibault,L.E. Acute alterations in [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> in NG108-15 cells subjected to high strain rate deformation and chemical hypoxia: an in vitro model for neural trauma. *J.Neurotrauma* 13[7], 395-407. 1996.
45. Chauhan,A.J., Krishna,M.T., Frew,A.J., & Holgate,S.T. Exposure to nitrogen dioxide (NO<sub>2</sub>) and respiratory disease risk. *Rev.Environ.Health* 13[1-2], 73-90. 1998.

46. Cherian,L., Chacko,G., Goodman,J.C., & Robertson,C.S. Cerebral hemodynamic effects of phenylephrine and L-arginine after cortical impact injury. *Crit Care Med.* 27[11], 2512-2517. 1999.
47. Cherian,L., Goodman,J.C., & Robertson,C.S. Brain nitric oxide changes after controlled cortical impact injury in rats. *J.Neurophysiol.* 83[4], 2171-2178. 2000.
48. Cherian,L., Hlatky,R., & Robertson,C.S. Nitric oxide in traumatic brain injury. *Brain Pathol.* 14[2], 195-201. 2004.
49. Cherian,L. & Robertson,C.S. 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[1], 77-85. 2003.
50. Cherian,L., Robertson,C.S., Contant,C.F., Jr., & Bryan,R.M., Jr. Lateral cortical impact injury in rats: cerebrovascular effects of varying depth of cortical deformation and impact velocity. *J.Neurotrauma* 11[5], 573-585. 1994.
51. Chesnut,R.M., Marshall,L.F., Klauber,M.R., Blunt,B.A., Baldwin,N., Eisenberg,H.M., Jane,J.A., Marmarou,A., & Foulkes,M.A. The role of secondary brain injury in determining outcome from severe head injury. *J.Trauma* 34[2], 216-222. 1993.
52. Cheung,P.Y., Peliowski,A., & Robertson,C.M. The outcome of very low birth weight neonates ( $\leq 1500$  g) rescued by inhaled nitric oxide: neurodevelopment in early childhood. *J.Pediatr.* 133[6], 735-739. 1998.
53. Chi,O.Z., Wei,H.M., Sinha,A.K., & Weiss,H.R. Effects of inhibition of nitric oxide synthase on blood-brain barrier transport in focal cerebral ischemia. *Pharmacology* 48[6], 367-373. 1994.
54. Cho,H.J., Xie,Q.W., Calaycay,J., Mumford,R.A., Swiderek,K.M., Lee,T.D., & Nathan,C. Calmodulin is a subunit of nitric oxide synthase from macrophages. *J.Exp.Med.* 176[2], 599-604. 1992.
55. Cholet,N., Seylaz,J., Lacombe,P., & Bonvento,G. Local uncoupling of the cerebrovascular and metabolic responses to somatosensory stimulation after neuronal nitric oxide synthase inhibition. *J.Cereb.Blood Flow Metab* 17[11], 1191-1201. 1997.
56. Cicinelli,E., Ignarro,L.J., Schonauer,L.M., Matteo,M.G., Galantino,P., & Falco,N. Different plasma levels of nitric oxide in arterial and venous blood. *Clin.Physiol* 19[5], 440-442. 1999.
57. Connolly,E.S., Jr., Winfree,C.J., Stern,D.M., Solomon,R.A., & Pinsky,D.J. Procedural and strain-related variables significantly affect outcome in a murine model of focal cerebral ischemia. *Neurosurgery* 38[3], 523-531. 1996.
58. Cortez,S.C., McIntosh,T.K., & Noble,L.J. Experimental fluid percussion brain injury: vascular disruption and neuronal and glial alterations. *Brain Res.* 482[2], 271-282. 1989.
59. Cosby,K., Partovi,K.S., Crawford,J.H., Patel,R.P., Reiter,C.D., Martyr,S., Yang,B.K., Waclawiw,M.A., Zalos,G., Xu,X., Huang,K.T., Shields,H., Kim-Shapiro,D.B., Schechter,A.N., Cannon,R.O., III, & Gladwin,M.T. Nitrite reduction to nitric oxide by deoxyhemoglobin vasodilates the human circulation. *Nat.Med.* 9[12], 1498-1505. 2003.
60. Crawford,J.H., Chacko,B.K., Pruitt,H.M., Piknova,B., Hogg,N., & Patel,R.P. Transduction of NO-bioactivity by the red blood cell in sepsis: novel mechanisms of vasodilation during acute inflammatory disease. *Blood* 104[5], 1375-1382. 2004.
61. Crawford,J.H., White,C.R., & Patel,R.P. Vasoactivity of S-nitrosohemoglobin: role of oxygen, heme, and NO oxidation states. *Blood* 101[11], 4408-4415. 2003.
62. Dakshinamurti,S. Pathophysiologic mechanisms of persistent pulmonary hypertension of the newborn. *Pediatr.Pulmonol.* 39[6], 492-503. 2005.
63. Dawson,T.M., Dawson,V.L., & Snyder,S.H. A novel neuronal messenger molecule in brain: the free radical, nitric oxide. *Ann.Neurol.* 32[3], 297-311. 1992.
64. Dawson,T.M. & Snyder,S.H. Gases as biological messengers: nitric oxide and carbon monoxide in the brain. *J.Neurosci.* 14[9], 5147-5159. 1994.
65. Dawson,V.L. Nitric oxide: role in neurotoxicity. *Clin.Exp.Pharmacol.Physiol* 22[4], 305-308. 1995.
66. Day,R.W., Lynch,J.M., White,K.S., & Ward,R.M. Acute response to inhaled nitric oxide in newborns with respiratory failure and pulmonary hypertension. *Pediatrics* 98[4 Pt 1], 698-705. 1996.
67. Dejana,E., Villa,S., & de Gaetano,G. Bleeding time in rats: a comparison of different experimental conditions. *Thromb.Haemost.* 48[1], 108-111. 1982.

68. Demoncheaux, E.A., Higenbottam, T.W., Foster, P.J., Borland, C.D., Smith, A.P., Marriott, H.M., Bee, D., Akamine, S., & Davies, M.B. Circulating nitrite anions are a directly acting vasodilator and are donors for nitric oxide. *Clin.Sci.(Lond)* 102[1], 77-83. 2002.
69. Dikalov, S. & Fink, B. ESR Techniques for the Detection of Nitric Oxide In Vivo and in Tissues. eds. Packer, L. & Cadenas, E. *Methods in Enzymology, Nitric Oxide, Part E.* [52], 597-610. 2005. San Diego, Elsevier Academic Press. *Methods in Enzymology*.
70. Dirnagl, U., Kaplan, B., Jacewicz, M., & Pulsinelli, W. Continuous measurement of cerebral cortical blood flow by laser-Doppler flowmetry in a rat stroke model. *J.Cereb.Blood Flow Metab* 9[5], 589-596. 1989.
71. Dirnagl, U., Niwa, K., Lindauer, U., & Villringer, A. Coupling of cerebral blood flow to neuronal activation: role of adenosine and nitric oxide. *Am.J.Physiol* 267[1 Pt 2], H296-H301. 1994.
72. Dixon, C.E., Clifton, G.L., Lighthall, J.W., Yaghai, A.A., & Hayes, R.L. A controlled cortical impact model of traumatic brain injury in the rat. *J.Neurosci.Methods* 39[3], 253-262. 1991.
73. Dixon, C.E., Kochanek, P.M., Yan, H.Q., Schiding, J.K., Griffith, R.G., Baum, E., Marion, D.W., & DeKosky, S.T. One-year study of spatial memory performance, brain morphology, and cholinergic markers after moderate controlled cortical impact in rats. *J.Neurotrauma* 16[2], 109-122. 1999.
74. Dixon, C.E., Lyeth, B.G., Povlishock, J.T., Findling, R.L., Hamm, R.J., Marmarou, A., Young, H.F., & Hayes, R.L. A fluid percussion model of experimental brain injury in the rat. *J.Neurosurg.* 67[1], 110-119. 1987.
75. Doel, J.J., Godber, B.L., Goult, T.A., Eisenthal, R., & Harrison, R. Reduction of organic nitrites to nitric oxide catalyzed by xanthine oxidase: possible role in metabolism of nitrovasodilators. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 270[3], 880-885. 2000.
76. Dopenberg, E.M., Choi, S.C., & Bullock, R. Clinical trials in traumatic brain injury: lessons for the future. *J.Neurosurg.Anesthesiol.* 16[1], 87-94. 2004.
77. Dou, Y., Mailliet, D.H., Eich, R.F., & Olson, J.S. Myoglobin as a model system for designing heme protein based blood substitutes. *Biophys.Chem.* 98[1-2], 127-148. 2002.
78. Doyle, M.P. & Hoekstra, J.W. Oxidation of nitrogen oxides by bound dioxygen in hemoproteins. *J.Inorg.Biochem.* 14[4], 351-358. 1981.
79. Ekekezie, I.I., Thibeault, D.W., Zwick, D.L., Rezaiekhaligh, M.H., Mabry, S.M., Morgan, R.E., Norberg, M., & Truog, W.E. Independent and combined effects of prolonged inhaled nitric oxide and oxygen on lung inflammation in newborn piglets. *Biol.Neonate* 77[1], 37-44. 2000.
80. Fattouch, K., Sbraga, F., Bianco, G., Speziale, G., Gucciardo, M., Sampognaro, R., & Ruvolo, G. Inhaled prostacyclin, nitric oxide, and nitroprusside in pulmonary hypertension after mitral valve replacement. *J.Card Surg.* 20[2], 171-176. 2005.
81. Fattouch, K., Sbraga, F., Sampognaro, R., Bianco, G., Gucciardo, M., Lavalle, C., Vizza, C.D., Fedele, F., & Ruvolo, G. Treatment of pulmonary hypertension in patients undergoing cardiac surgery with cardiopulmonary bypass: a randomized, prospective, double-blind study. *J.Cardiovasc.Med.(Hagerstown.)* 7[2], 119-123. 2006.
82. Feelisch, M., Rassaf, T., Mnaimneh, S., Singh, N., Bryan, N.S., Jour'd'Heuil, D., & Kelm, M. Concomitant S-, N-, and heme-nitros(yl)ation in biological tissues and fluids: implications for the fate of NO in vivo. *FASEB J.* 16[13], 1775-1785. 2002.
83. Filep, J.G., Foldes-Filep, E., & Sirois, P. Nitric oxide modulates vascular permeability in the rat coronary circulation. *Br.J.Pharmacol.* 108[2], 323-326. 1993.
84. Finer, N.N. & Barrington, K.J. Nitric oxide therapy for the newborn infant. *Semin.Perinatol.* 24[1], 59-65. 2000.
85. Finer, N.N. & Barrington, K.J. Nitric oxide for respiratory failure in infants born at or near term. *Cochrane.Database.Syst.Rev.* [4], CD000399. 2006.
86. Fink, B., Dikalov, S., & Fink, N. ESR techniques for the detection of nitric oxide in vivo as an index of endothelial function. *Pharmacol.Rep.* 58 Suppl, 8-15. 2006.
87. Fleming, I., Gray, G.A., Schott, C., & Stoclet, J.C. Inducible but not constitutive production of nitric oxide by vascular smooth muscle cells. *Eur.J.Pharmacol.* 200[2-3], 375-376. 1991.
88. Forman, L.J., Liu, P., Nagele, R.G., Yin, K., & Wong, P.Y. Augmentation of nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite production during cerebral ischemia and reperfusion in the rat. *Neurochem.Res.* 23[2], 141-148. 1998.
89. Fox, G.B., Fan, L., LeVasseur, R.A., & Faden, A.I. Effect of traumatic brain injury on mouse spatial and nonspatial learning in the Barnes circular maze. *J.Neurotrauma* 15[12], 1037-1046. 1998.



90. Fox,K., Garcia,M.A., Ardissino,D., Buszman,P., Camici,P.G., Crea,F., Daly,C., De Backer,G., Hjemdahl,P., Lopez-Sendon,J., Marco,J., Morais,J., Pepper,J., Sechtem,U., Simoons,M., Thygesen,K., Priori,S.G., Blanc,J.J., Budaj,A., Camm,J., Dean,V., Deckers,J., Dickstein,K., Lekakis,J., McGregor,K., Metra,M., Morais,J., Osterspey,A., Tamargo,J., & Zamorano,J.L. Guidelines on the management of stable angina pectoris: executive summary: the Task Force on the Management of Stable Angina Pectoris of the European Society of Cardiology. *Eur.Heart J.* 27[11], 1341-1381. 2006.
91. Fox-Robichaud,A., Payne,D., Hasan,S.U., Ostrovsky,L., Fairhead,T., Reinhardt,P., & Kubes,P. Inhaled NO as a viable antiadhesive therapy for ischemia/reperfusion injury of distal microvascular beds. *J.Clin.Invest* 101[11], 2497-2505. 1998.
92. Frank,D.U., Horstman,D.J., Morris,G.N., Johns,R.A., & Rich,G.F. Regulation of the endogenous NO pathway by prolonged inhaled NO in rats. *J.Appl.Physiol* 85[3], 1070-1078. 1998.
93. Fratacci,M.D., Frostell,C.G., Chen,T.Y., Wain,J.C., Jr., Robinson,D.R., & Zapol,W.M. Inhaled nitric oxide. A selective pulmonary vasodilator of heparin-protamine vasoconstriction in sheep. *Anesthesiology* 75[6], 990-999. 1991.
94. Frostell,C., Fratacci,M.D., Wain,J.C., Jones,R., & Zapol,W.M. Inhaled nitric oxide. A selective pulmonary vasodilator reversing hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Circulation* 83[6], 2038-2047. 1991.
95. Frostell,C.G., Blomqvist,H., Hedenstierna,G., Lundberg,J., & Zapol,W.M. Inhaled nitric oxide selectively reverses human hypoxic pulmonary vasoconstriction without causing systemic vasodilation. *Anesthesiology* 78[3], 427-435. 1993.
96. Fukatsu,K., Saito,H., Han,I., Furukawa,S., Lin,M.T., Matsuda,T., Ikeda,S., Inoue,T., Yasuhara,H., & Muto,T. Nitric oxide donor decreases neutrophil adhesion in both lung and peritoneum during peritonitis. *J.Surg.Res.* 74[2], 119-124. 1998.
97. Fukuto,J.M., Chiang,K., Hsieh,R., Wong,P., & Chaudhuri,G. The pharmacological activity of nitroxyl: a potent vasodilator with activity similar to nitric oxide and/or endothelium-derived relaxing factor. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 263[2], 546-551. 1992.
98. Furchgott,R.F. A research trail over half a century. *Annu.Rev.Pharmacol.Toxicol.* 35, 1-27. 1995.
99. Furchgott,R.F. The 1996 Albert Lasker Medical Research Awards. The discovery of endothelium-derived relaxing factor and its importance in the identification of nitric oxide. *JAMA* 276[14], 1186-1188. 1996.
100. Furchgott,R.F., Carvalho,M.H., Khan,M.T., & Matsunaga,K. Evidence for endothelium-dependent vasodilation of resistance vessels by acetylcholine. *Blood Vessels* 24[3], 145-149. 1987.
101. Furchgott,R.F. & Zawadzki,J.V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 288[5789], 373-376. 1980.
102. Gahm,C., Holmin,S., & Mathiesen,T. Temporal profiles and cellular sources of three nitric oxide synthase isoforms in the brain after experimental contusion. *Neurosurgery* 46[1], 169-177. 2000.
103. Gahm,C., Holmin,S., & Mathiesen,T. Nitric oxide synthase expression after human brain contusion. *Neurosurgery* 50[6], 1319-1326. 2002.
104. Garg,U.C. & Hassid,A. Nitric oxide-generating vasodilators and 8-bromo-cyclic guanosine monophosphate inhibit mitogenesis and proliferation of cultured rat vascular smooth muscle cells. *J.Clin.Invest* 83[5], 1774-1777. 1989.
105. Garnett,M.R., Blamire,A.M., Corkill,R.G., Rajagopalan,B., Young,J.D., Cadoux-Hudson,T.A., & Styles,P. Abnormal cerebral blood volume in regions of contused and normal appearing brain following traumatic brain injury using perfusion magnetic resonance imaging. *J.Neurotrauma* 18[6], 585-593. 2001.
106. Garthwaite,J. Glutamate, nitric oxide and cell-cell signalling in the nervous system. *Trends Neurosci.* 14[2], 60-67. 1991.
107. Garthwaite,J., Charles,S.L., & Chess-Williams,R. Endothelium-derived relaxing factor release on activation of NMDA receptors suggests role as intercellular messenger in the brain. *Nature* 336[6197], 385-388. 1988.
108. George,T.N., Johnson,K.J., Bates,J.N., & Segar,J.L. The effect of inhaled nitric oxide therapy on bleeding time and platelet aggregation in neonates. *J.Pediatr.* 132[4], 731-734. 1998.
109. Germann,P., Braschi,A., Della,R.G., Dinh-Xuan,A.T., Falke,K., Frostell,C., Gustafsson,L.E., Herve,P., Jolliet,P., Kaisers,U., Litvan,H., Macrae,D.J., Maggiorini,M., Marczin,N., Mueller,B., Payen,D., Ranucci,M., Schranz,D., Zimmermann,R., & Ullrich,R. Inhaled nitric oxide therapy in adults: European expert recommendations. *Intensive Care Med.* 31[8], 1029-1041. 2005.
110. Germann,P., Braschi,A., Della,R.G., Dinh-Xuan,A.T., Falke,K., Frostell,C., Gustafsson,L.E., Herve,P., Jolliet,P., Kaisers,U., Litvan,H., Macrae,D.J., Maggiorini,M., Marczin,N., Mueller,B., Payen,D., Ranucci,M., Schranz,D.,

- Zimmermann,R., & Ullrich,R. Inhaled nitric oxide therapy in adults: European expert recommendations. *Intensive Care Med.* 31[8], 1029-1041. 2005.
111. Germann,P., Braschi,A., Della,R.G., Dinh-Xuan,A.T., Falke,K., Frostell,C., Gustafsson,L.E., Herve,P., Jolliet,P., Kaisers,U., Litvan,H., Macrae,D.J., Maggiorini,M., Marczin,N., Mueller,B., Payen,D., Ranucci,M., Schranz,D., Zimmermann,R., & Ullrich,R. Inhaled nitric oxide therapy in adults: European expert recommendations. *Intensive Care Med.* 31[8], 1029-1041. 2005.
  112. Ghajar,J. Traumatic brain injury. *Lancet* 356[9233], 923-929. 2000.
  113. Gibson,W.H. & Roughton,F.J. The kinetics and equilibria of the reactions of nitric oxide with sheep haemoglobin. *J.Physiol* 136[3], 507-524. 1957.
  114. Gladwin,M.T., Crawford,J.H., & Patel,R.P. The biochemistry of nitric oxide, nitrite, and hemoglobin: role in blood flow regulation. *Free Radic.Biol.Med.* 36[6], 707-717. 2004.
  115. Gladwin,M.T., Lancaster,J.R., Jr., Freeman,B.A., & Schechter,A.N. Nitric oxide's reactions with hemoglobin: a view through the SNO-storm. *Nat.Med.* 9[5], 496-500. 2003.
  116. Gladwin,M.T., Ognibene,F.P., Pannell,L.K., Nichols,J.S., Pease-Fye,M.E., Shelhamer,J.H., & Schechter,A.N. Relative role of heme nitrosylation and beta-cysteine 93 nitrosation in the transport and metabolism of nitric oxide by hemoglobin in the human circulation. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 97[18], 9943-9948. 2000.
  117. Gladwin,M.T., Shelhamer,J.H., Schechter,A.N., Pease-Fye,M.E., Waclawiw,M.A., Panza,J.A., Ognibene,F.P., & Cannon,R.O., III. Role of circulating nitrite and S-nitrosohemoglobin in the regulation of regional blood flow in humans. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 97[21], 11482-11487. 2000.
  118. Gladwin,M.T., Wang,X., Reiter,C.D., Yang,B.K., Vivas,E.X., Bonaventura,C., & Schechter,A.N. S-Nitrosohemoglobin is unstable in the reductive erythrocyte environment and lacks O<sub>2</sub>/NO-linked allosteric function. *J.Biol.Chem.* 277[31], 27818-27828. 2002.
  119. Gnanaratnem,J. & Finer,N.N. Neonatal acute respiratory failure. *Curr.Opin.Pediatr.* 12[3], 227-232. 2000.
  120. Godber,B.L., Doel,J.J., Sapkota,G.P., Blake,D.R., Stevens,C.R., Eisenthal,R., & Harrison,R. Reduction of nitrite to nitric oxide catalyzed by xanthine oxidoreductase. *J.Biol.Chem.* 275[11], 7757-7763. 2000.
  121. Goodman,J.C., Cherian,L., Bryan,R.M., Jr., & Robertson,C.S. Lateral cortical impact injury in rats: pathologic effects of varying cortical compression and impact velocity. *J.Neurotrauma* 11[5], 587-597. 1994.
  122. Gothberg,S., Edberg,K.E., Tang,S.F., Michelsen,S., Winberg,P., Holmgren,D., Miller,O., Thaulow,E., & Lonnqvist,P.A. Residual pulmonary hypertension in children after treatment with inhaled nitric oxide: a follow-up study regarding cardiopulmonary and neurological symptoms. *Acta Paediatr.* 89[12], 1414-1419. 2000.
  123. Gotoh,J., Kuang,T.Y., Nakao,Y., Cohen,D.M., Melzer,P., Itoh,Y., Pak,H., Pettigrew,K., & Sokoloff,L. Regional differences in mechanisms of cerebral circulatory response to neuronal activation. *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol* 280[2], H821-H829. 2001.
  124. Gow,A.J. & Stamler,J.S. Reactions between nitric oxide and haemoglobin under physiological conditions. *Nature* 391[6663], 169-173. 1998.
  125. Graham,D.I., Adams,J.H., & Doyle,D. Ischaemic brain damage in fatal non-missile head injuries. *J.Neurol.Sci.* 39[2-3], 213-234. 1978.
  126. Grandati,M., Verrecchia,C., Revaud,M.L., Allix,M., Boulu,R.G., & Plotkine,M. Calcium-independent NO-synthase activity and nitrites/nitrates production in transient focal cerebral ischaemia in mice. *Br.J.Pharmacol.* 122[4], 625-630. 1997.
  127. Greenfield,L.J., Jr. & Albers,J.W. Nitric oxide and motor neuron disease. *N.Engl.J.Med.* 333[8], 522-523. 1995.
  128. Gries,A., Bottiger,B.W., Dorsam,J., Bauer,H., Weimann,J., Bode,C., Martin,E., & Motsch,J. Inhaled nitric oxide inhibits platelet aggregation after pulmonary embolism in pigs. *Anesthesiology* 86[2], 387-393. 1997.
  129. Gries,A., Herr,A., Motsch,J., Holzmann,A., Weimann,J., Taut,F., Erbe,N., Bode,C., & Martin,E. Randomized, placebo-controlled, blinded and cross-matched study on the antiplatelet effect of inhaled nitric oxide in healthy volunteers. *Thromb.Haemost.* 83[2], 309-315. 2000.
  130. Griffiths,M.J. & Evans,T.W. Inhaled nitric oxide therapy in adults. *N.Engl.J.Med.* 353[25], 2683-2695. 2005.
  131. Gruetter,C.A., Gruetter,D.Y., Lyon,J.E., Kadowitz,P.J., & Ignarro,L.J. Relationship between cyclic guanosine 3':5'-monophosphate formation and relaxation of coronary arterial smooth muscle by glyceryl trinitrate, nitroprusside, nitrite and nitric oxide: effects of methylene blue and methemoglobin. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 219[1], 181-186. 1981.

132. Haberny,K.A., Pou,S., & Eccles,C.U. Potentiation of quinolinate-induced hippocampal lesions by inhibition of NO synthesis. *Neurosci.Lett.* 146[2], 187-190. 1992.
133. Hacke,W., Donnan,G., Fieschi,C., Kaste,M., von Kummer,R., Broderick,J.P., Brott,T., Frankel,M., Grotta,J.C., Haley,E.C., Jr., Kwiatkowski,T., Levine,S.R., Lewandowski,C., Lu,M., Lyden,P., Marler,J.R., Patel,S., Tilley,B.C., Albers,G., Bluhmki,E., Wilhelm,M., & Hamilton,S. Association of outcome with early stroke treatment: pooled analysis of ATLANTIS, ECASS, and NINDS rt-PA stroke trials. *Lancet* 363[9411], 768-774. 2004.
134. Hacke,W., Kaste,M., Fieschi,C., von Kummer,R., Davalos,A., Meier,D., Larrue,V., Bluhmki,E., Davis,S., Donnan,G., Schneider,D., Diez-Tejedor,E., & Trouillas,P. Randomised double-blind placebo-controlled trial of thrombolytic therapy with intravenous alteplase in acute ischaemic stroke (ECASS II). Second European-Australasian Acute Stroke Study Investigators. *Lancet* 352[9136], 1245-1251. 1998.
135. Hakim,A.M. The cerebral ischemic penumbra. *Can.J.Neurol.Sci.* 14[4], 557-559. 1987.
136. Hallman,M., Bry,K., Turbow,R., Waffarn,F., & Lappalainen,U. Pulmonary toxicity associated with nitric oxide in term infants with severe respiratory failure. *J.Pediatr.* 132[5], 827-829. 1998.
137. Hannay,H.J., Feldman,Z., Phan,P., Keyani,A., Panwar,N., Goodman,J.C., & Robertson,C.S. Validation of a controlled cortical impact model of head injury in mice. *J.Neurotrauma* 16[11], 1103-1114. 1999.
138. Harrison,R. Structure and function of xanthine oxidoreductase: where are we now? *Free Radic.Biol.Med* 33[6], 774-797. 2002.
139. Harrison,R. Physiological roles of xanthine oxidoreductase. *Drug Metab Rev.* 36[2], 363-375. 2004.
140. Hataishi,R., Zapol,W.M., Bloch,K.D., & Ichinose,F. Inhaled nitric oxide does not reduce systemic vascular resistance in mice. *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol* 290[5], H1826-H1829. 2006.
141. Hausladen,A., Rafikov,R., Angelo,M., Singel,D.J., Nudler,E., & Stamler,J.S. Assessment of nitric oxide signals by triiodide chemiluminescence. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 104[7], 2157-2162. 2007.
142. Henley,C.M., Muszynski,C., Cherian,L., & Robertson,C.S. Activation of ornithine decarboxylase and accumulation of putrescine after traumatic brain injury. *J.Neurotrauma* 13[9], 487-496. 1996.
143. Herold,S. & Rehmann,F.J. Kinetics of the reactions of nitrogen monoxide and nitrite with ferryl hemoglobin. *Free Radic.Biol.Med.* 34[5], 531-545. 2003.
144. Hess,J.R., Macdonald,V.W., & Brinkley,W.W. Systemic and pulmonary hypertension after resuscitation with cell-free hemoglobin. *J.Appl.Physiol* 74[4], 1769-1778. 1993.
145. Heymann,M.A., Payne,B.D., Hoffman,J.I., & Rudolph,A.M. Blood flow measurements with radionuclide-labeled particles. *Prog.Cardiovasc.Dis.* 20[1], 55-79. 1977.
146. Hildenbrandt,H. *Pschyrembel Klinisches Wörterbuch.* eds. Dornblüth, O. & Pschyrembel, W. 257. Walter de Gruyter GmbH. Berlin . 1994.1994.
147. Hillman,N.D., Cheifetz,I.M., Craig,D.M., Smith,P.K., Ungerleider,R.M., & Meliones,J.N. 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[6], 1006-1013. 1997.
148. Hishikawa,K., Nakaki,T., Suzuki,H., Saruta,T., & Kato,R. L-arginine-induced hypotension, *Lancet* 337[8742], 683-684. 1991.
149. Hlatky,R., Furuya,Y., Valadka,A.B., Goodman,J.C., & Robertson,C.S. Comparison of microdialysate arginine and glutamate levels in severely head-injured patient. *Acta Neurochir.Suppl* 81, 347-349. 2002.
150. Hlatky,R., Lui,H., Cherian,L., Goodman,J.C., O'Brien,W.E., Contant,C.F., & Robertson,C.S. The role of endothelial nitric oxide synthase in the cerebral hemodynamics after controlled cortical impact injury in mice. *J.Neurotrauma* 20[10], 995-1006. 2003.
151. Hobbs,A.J., Gladwin,M.T., Patel,R.P., Williams,D.L., & Butler,A.R. Haemoglobin: NO transporter, NO inactivator or NO one of the above? *Trends Pharmacol.Sci.* 23[9], 406-411. 2002.
152. Hogman,M., Frostell,C., Amberg,H., & Hedenstierna,G. Bleeding time prolongation and NO inhalation. *Lancet* 341[8861], 1664-1665. 1993.
153. Hogman,M., Frostell,C., Amberg,H., Sandhagen,B., & Hedenstierna,G. Prolonged bleeding time during nitric oxide inhalation in the rabbit. *Acta Physiol Scand.* 151[1], 125-129. 1994.
154. Hu,J., Mahmoud,M.I., & el Fakahany,E.E. Polyamines inhibit nitric oxide synthase in rat cerebellum. *Neurosci.Lett.* 175[1-2], 41-45. 1994.

155. Huang,Z., Huang,P.L., Ma,J., Meng,W., Ayata,C., Fishman,M.C., & Moskowitz,M.A. Enlarged infarcts in endothelial nitric oxide synthase knockout mice are attenuated by nitro-L-arginine. *J.Cereb.Blood Flow Metab* 16[5], 981-987. 1996.
156. Hudetz,A.G., Conger,K.A., Eke,A., & Halsey,J.H., Jr. A mathematical model of the intracerebral steal phenomenon in regional and focal ischaemia. *Neurol.Res.* 15[2], 117-127. 1993.
157. Hudetz,A.G., Shen,H., & Kampine,J.P. Nitric oxide from neuronal NOS plays critical role in cerebral capillary flow response to hypoxia. *Am.J.Physiol* 274[3 Pt 2], H982-H989. 1998.
158. Hughes,R. & Dake,J. *A Cyclopedia of Drug Pathogenesis.* Boerike and Tafel. New York . 1888.
159. Hugod,C. Effect of exposure to 43 ppm nitric oxide and 3.6 ppm nitrogen dioxide on rabbit lung. A light and electron microscopic study. *Int.Arch.Occup.Environ.Health* 42[3-4], 159-167. 1979.
160. Iadecola,C. Does nitric oxide mediate the increases in cerebral blood flow elicited by hypercapnia? *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 89[9], 3913-3916. 1992.
161. Iadecola,C., Beitz,A.J., Renno,W., Xu,X., Mayer,B., & Zhang,F. Nitric oxide synthase-containing neural processes on large cerebral arteries and cerebral microvessels. *Brain Res.* 606[1], 148-155. 1993.
162. Iadecola,C., Pelligrino,D.A., Moskowitz,M.A., & Lassen,N.A. Nitric oxide synthase inhibition and cerebrovascular regulation. *J.Cereb.Blood Flow Metab* 14[2], 175-192. 1994.
163. Iadecola,C., Zhang,F., Casey,R., Clark,H.B., & Ross,M.E. Inducible nitric oxide synthase gene expression in vascular cells after transient focal cerebral ischemia. *Stroke* 27[8], 1373-1380. 1996.
164. Iadecola,C., Zhang,F., Xu,S., Casey,R., & Ross,M.E. Inducible nitric oxide synthase gene expression in brain following cerebral ischemia. *J.Cereb.Blood Flow Metab* 15[3], 378-384. 1995.
165. Iadecola,C., Zhang,F., & Xu,X. Inhibition of inducible nitric oxide synthase ameliorates cerebral ischemic damage. *Am.J.Physiol* 268[1 Pt 2], R286-R292. 1995.
166. Ignarro,L.J., Adams,J.B., Horwitz,P.M., & Wood,K.S. Activation of soluble guanylate cyclase by NO-hemoproteins involves NO-heme exchange. Comparison of heme-containing and heme-deficient enzyme forms. *J.Biol.Chem.* 261[11], 4997-5002. 1986.
167. Ignarro,L.J., Buga,G.M., Byrns,R.E., Wood,K.S., & Chaudhuri,G. Endothelium-derived relaxing factor and nitric oxide possess identical pharmacologic properties as relaxants of bovine arterial and venous smooth muscle. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 246[1], 218-226. 1988.
168. Ignarro,L.J., Buga,G.M., Wood,K.S., Byrns,R.E., & Chaudhuri,G. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 84[24], 9265-9269. 1987.
169. Ignarro,L.J., Byrns,R.E., Buga,G.M., & Wood,K.S. Endothelium-derived relaxing factor from pulmonary artery and vein possesses pharmacologic and chemical properties identical to those of nitric oxide radical. *Circ.Res.* 61[6], 866-879. 1987.
170. Ignarro,L.J., Byrns,R.E., Buga,G.M., Wood,K.S., & Chaudhuri,G. Pharmacological evidence that endothelium-derived relaxing factor is nitric oxide: use of pyrogallol and superoxide dismutase to study endothelium-dependent and nitric oxide-elicited vascular smooth muscle relaxation. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 244[1], 181-189. 1988.
171. Ignarro,L.J., Fukuto,J.M., Griscavage,J.M., Rogers,N.E., & Byrns,R.E. Oxidation of nitric oxide in aqueous solution to nitrite but not nitrate: comparison with enzymatically formed nitric oxide from L-arginine. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 90[17], 8103-8107. 1993.
172. Ignarro,L.J., Lippton,H., Edwards,J.C., Baricos,W.H., Hyman,A.L., Kadowitz,P.J., & Gruetter,C.A. Mechanism of vascular smooth muscle relaxation by organic nitrates, nitrites, nitroprusside and nitric oxide: evidence for the involvement of S-nitrosothiols as active intermediates. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 218[3], 739-749. 1981.
173. Inglessis,I., Shin,J.T., Lepore,J.J., Palacios,I.F., Zapol,W.M., Bloch,K.D., & Semigran,M.J. Hemodynamic effects of inhaled nitric oxide in right ventricular myocardial infarction and cardiogenic shock. *J.Am.Coll.Cardiol.* 44[4], 793-798. 2004.
174. Iversen,H.H., Gustafsson,L.E., Leone,A.M., & Wiklund,N.P. Smooth muscle relaxing effects of NO, nitrosothiols and a nerve-induced relaxing factor released in guinea-pig colon. *Br.J.Pharmacol.* 113[4], 1088-1092. 1994.
175. Jacobs,A., Put,E., Ingels,M., & Bossuyt,A. Prospective evaluation of technetium-99m-HMPAO SPECT in mild and moderate traumatic brain injury. *J.Nucl.Med.* 35[6], 942-947. 1994.
176. Jacobs,A., Put,E., Ingels,M., Put,T., & Bossuyt,A. One-year follow-up of technetium-99m-HMPAO SPECT in mild head injury. *J.Nucl.Med.* 37[10], 1605-1609. 1996.

177. Jay,T.M., Lucignani,G., Crane,A.M., Jehle,J., & Sokoloff,L. Measurement of local cerebral blood flow with [14C]iodoantipyrine in the mouse. *J.Cereb.Blood Flow Metab* 8[1], 121-129. 1988.
178. Jenkins,L.W., Moszynski,K., Lyeth,B.G., Lewelt,W., DeWitt,D.S., Allen,A., Dixon,C.E., Povlishock,J.T., Majewski,T.J., Clifton,G.L., & . Increased vulnerability of the mildly traumatized rat brain to cerebral ischemia: the use of controlled secondary ischemia as a research tool to identify common or different mechanisms contributing to mechanical and ischemic brain injury. *Brain Res.* 477[1-2], 211-224. 1989.
179. Jia,L., Bonaventura,C., Bonaventura,J., & Stamler,J.S. S-nitrosohaemoglobin: a dynamic activity of blood involved in vascular control. *Nature* 380[6571], 221-226. 1996.
180. Kader,A., Frazzini,V.I., Solomon,R.A., & Trifiletti,R.R. Nitric oxide production during focal cerebral ischemia in rats. *Stroke* 24[11], 1709-1716. 1993.
181. Kanwar,S. & Kubes,P. Nitric oxide is an antiadhesive molecule for leukocytes. *New Horiz.* 3[1], 93-104. 1995.
182. Katayama,Y., Becker,D.P., Tamura,T., & Hovda,D.A. Massive increases in extracellular potassium and the indiscriminate release of glutamate following concussive brain injury. *J.Neurosurg.* 73[6], 889-900. 1990.
183. Katayama,Y., Hatanaka,K., Hayashi,T., Onoda,K., Yada,I., Namikawa,S., Yuasa,H., Kusagawa,M., Maruyama,K., & Kitabatake,M. Effects of inhaled nitric oxide in rats with chemically induced pulmonary hypertension. *Respir.Physiol* 97[3], 301-307. 1994.
184. Katayama,Y., Maeda,T., Koshinaga,M., Kawamata,T., & Tsubokawa,T. Role of excitatory amino acid-mediated ionic fluxes in traumatic brain injury. *Brain Pathol.* 5[4], 427-435. 1995.
185. Katoh,H., Shima,K., Nawashiro,H., Wada,K., & Chigasaki,H. Selective hippocampal damage to hypoxia after mild closed head injury in the rat. *Acta Neurochir.Suppl* 71, 247-249. 1998.
186. Katsouyanni,K. Ambient air pollution and health. *Br.Med Bull.* 68, 143-156. 2003.
187. Kellie,G. An account with some reflections on the pathology of the brain. *Edinburgh Med Chir Soc Trans* 1, 84-169. 1824.
188. Kelly,D.F., Martin,N.A., Kordestani,R., Counelis,G., Hovda,D.A., Bergsneider,M., McBride,D.Q., Shalmon,E., Herman,D., & Becker,D.P. Cerebral blood flow as a predictor of outcome following traumatic brain injury. *J.Neurosurg.* 86[4], 633-641. 1997.
189. Kenne,F. & Ruuth (Übs),M. Alfred Nobel. A biography. 2. Arcade Publishing. New York . 2006.
190. Kerमारrec,N., Zunic,P., Beloucif,S., Benessiano,J., Drouet,L., & Payen,D. Impact of inhaled nitric oxide on platelet aggregation and fibrinolysis in rats with endotoxic lung injury. Role of cyclic guanosine 5'-monophosphate. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* 158[3], 833-839. 1998.
191. Kielbasa,W.B. & Fung,H.L. Systemic biochemical effects of inhaled NO in rats: increased expressions of NOS III, nitrotyrosine-, and phosphotyrosine-immunoreactive proteins in liver and kidney tissues. *Nitric.Oxide.* 5[6], 587-594. 2001.
192. Kim,N., Vardi,Y., Padma-Nathan,H., Daley,J., Goldstein,I., & Saenz,d.T., I. Oxygen tension regulates the nitric oxide pathway. Physiological role in penile erection. *J.Clin.Invest* 91[2], 437-442. 1993.
193. Kinsella,J.P., Neish,S.R., Ivy,D.D., Shaffer,E., & Abman,S.H. Clinical responses to prolonged treatment of persistent pulmonary hypertension of the newborn with low doses of inhaled nitric oxide. *J.Pediatr.* 123[1], 103-108. 1993.
194. Kinsella,J.P., Neish,S.R., Shaffer,E., & Abman,S.H. Low-dose inhalation nitric oxide in persistent pulmonary hypertension of the newborn. *Lancet* 340[8823], 819-820. 1992.
195. Kinsella,J.P., Parker,T.A., Galan,H., Sheridan,B.C., Halbower,A.C., & Abman,S.H. Effects of inhaled nitric oxide on pulmonary edema and lung neutrophil accumulation in severe experimental hyaline membrane disease. *Pediatr.Res.* 41[4 Pt 1], 457-463. 1997.
196. Kinsella,J.P., Walsh,W.F., Bose,C.L., Gerstmann,D.R., Labella,J.J., Sardesai,S., Walsh-Sukys,M.C., McCaffrey,M.J., Cornfield,D.N., Bhutani,V.K., Cutter,G.R., Baier,M., & Abman,S.H. Inhaled nitric oxide in premature neonates with severe hypoxaemic respiratory failure: a randomised controlled trial. *Lancet* 354[9184], 1061-1065. 1999.
197. Kirkeby,O.J., Rise,I.R., Nordsletten,L., Skjeldal,S., Hall,C., & Risoe,C. Cerebral blood flow measured with intracerebral laser-Dopplerflow probes and radioactive microspheres. *J.Appl.Physiol* 79[5], 1479-1486. 1995.
198. Kita,H. & Marmarou,A. The cause of acute brain swelling after the closed head injury in rats. *Acta Neurochir.Suppl (Wien.)* 60, 452-455. 1994.

199. Klahr,S. The role of nitric oxide in hypertension and renal disease progression. *Nephrol.Dial.Transplant.* 16 Suppl 1, 60-62. 2001.
200. Klahr,S. & Morrissey,J. Renal disease: the two faces of nitric oxide. *Lab Invest* 72[1], 1-3. 1995.
201. Knowles,R.G., Palacios,M., Palmer,R.M., & Moncada,S. Formation of nitric oxide from L-arginine in the central nervous system: a transduction mechanism for stimulation of the soluble guanylate cyclase. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 86[13], 5159-5162. 1989.
202. Kobari,M., Fukuuchi,Y., Tomita,M., Tanahashi,N., & Takeda,H. Role of nitric oxide in regulation of cerebral microvascular tone and autoregulation of cerebral blood flow in cats. *Brain Res.* 667[2], 255-262. 1994.
203. Kochanek,P.M., Marion,D.W., Zhang,W., Schiding,J.K., White,M., Palmer,A.M., Clark,R.S., O'Malley,M.E., Styren,S.D., & Ho,C. Severe controlled cortical impact in rats: assessment of cerebral edema, blood flow, and contusion volume. *J.Neurotrauma* 12[6], 1015-1025. 1995.
204. Koppenol,W.H., Moreno,J.J., Pryor,W.A., Ischiropoulos,H., & Beckman,J.S. Peroxynitrite, a cloaked oxidant formed by nitric oxide and superoxide. *Chem.Res.Toxicol.* 5[6], 834-842. 1992.
205. Kotapka,M.J., Gennarelli,T.A., Graham,D.I., Adams,J.H., Thibault,L.E., Ross,D.T., & Ford,I. Selective vulnerability of hippocampal neurons in acceleration-induced experimental head injury. *J.Neurotrauma* 8[4], 247-258. 1991.
206. Krasuski,R.A., Warner,J.J., Wang,A., Harrison,J.K., Tapson,V.F., & Bashore,T.M. Inhaled nitric oxide selectively dilates pulmonary vasculature in adult patients with pulmonary hypertension, irrespective of etiology. *J.Am.Coll.Cardiol.* 36[7], 2204-2211. 2000.
207. Krejcy,K., Schmetterer,L., Kastner,J., Nieszpaur-Los,M., Monitzer,B., Schutz,W., Eichler,H.G., & Kyrle,P.A. Role of nitric oxide in hemostatic system activation in vivo in humans. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 15[11], 2063-2067. 1995.
208. Kubes,P., Suzuki,M., & Granger,D.N. Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 88[11], 4651-4655. 1991.
209. Kuebler,W.M., Kisch-Wedel,H., Kemming,G.I., Meisner,F., Bruhn,S., Koehler,C., Flondor,M., Messmer,K., & Zwissler,B. Inhaled nitric oxide induces cerebrovascular effects in anesthetized pigs. *Neurosci.Lett.* 348[2], 85-88. 2003.
210. Kusuda,S., Shishida,N., Miyagi,N., Hirabayashi,M., & Kim,T.J. Cerebral blood flow during treatment for pulmonary hypertension. *Arch.Dis.Child Fetal Neonatal Ed* 80[1], F30-F33. 1999.
211. Lamas,S., Marsden,P.A., Li,G.K., Tempst,P., & Michel,T. Endothelial nitric oxide synthase: molecular cloning and characterization of a distinct constitutive enzyme isoform. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 89[14], 6348-6352. 1992.
212. Langford,E.J., Brown,A.S., Wainwright,R.J., de Belder,A.J., Thomas,M.R., Smith,R.E., Radomski,M.W., Martin,J.F., & Moncada,S. Inhibition of platelet activity by S-nitrosoglutathione during coronary angioplasty. *Lancet* 344[8935], 1458-1460. 1994.
213. LaPlaca,M.C. & Thibault,L.E. Dynamic mechanical deformation of neurons triggers an acute calcium response and cell injury involving the N-methyl-D-aspartate glutamate receptor. *J.Neurosci.Res.* 52[2], 220-229. 1998.
214. Lassen,N.A. Pathophysiology of brain ischemia as it relates to the therapy of acute ischemic stroke. *Clin.Neuropharmacol.* 13 Suppl 3, S1-S8. 1990.
215. Lauer,T., Preik,M., Rassaf,T., Strauer,B.E., Deussen,A., Feelisch,M., & Kelm,M. Plasma nitrite rather than nitrate reflects regional endothelial nitric oxide synthase activity but lacks intrinsic vasodilator action. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 98[22], 12814-12819. 2001.
216. Laustiola,K.E., Vuorinen,P., Porsti,I., Metsa-Ketela,T., Manninen,V., & Vapaatalo,H. Exogenous GTP enhances the effects of sodium nitrite on cyclic GMP accumulation, vascular smooth muscle relaxation and platelet aggregation. *Pharmacol.Toxicol.* 68[1], 60-63. 1991.
217. Leist,M., Fava,E., Montecucco,C., & Nicotera,P. Peroxynitrite and nitric oxide donors induce neuronal apoptosis by eliciting autocrine excitotoxicity. *Eur.J.Neurosci.* 9[7], 1488-1498. 1997.
218. Lepore,J.J., Maroo,A., Pereira,N.L., Ginns,L.C., Dec,G.W., Zapol,W.M., Bloch,K.D., & Semigran,M.J. Effect of sildenafil on the acute pulmonary vasodilator response to inhaled nitric oxide in adults with primary pulmonary hypertension. *Am.J.Cardiol.* 90[6], 677-680. 2002.
219. Li,H. & Poulos,T.L. Structure-function studies on nitric oxide synthases. *J.Inorg.Biochem.* 99[1], 293-305. 2005.

220. Li,H., Samouilov,A., Liu,X., & Zweier,J.L. Characterization of the magnitude and kinetics of xanthine oxidase-catalyzed nitrate reduction: evaluation of its role in nitrite and nitric oxide generation in anoxic tissues. *Biochemistry* 42[4], 1150-1159. 2003.
221. Lighthall,J.W. Controlled cortical impact: a new experimental brain injury model. *J.Neurotrauma* 5[1], 1-15. 1988.
222. Lighthall,J.W., Goshgarian,H.G., & Pinderski,C.R. Characterization of axonal injury produced by controlled cortical impact. *J.Neurotrauma* 7[2], 65-76. 1990.
223. Lincoln,T.M. & Cornwell,T.L. Intracellular cyclic GMP receptor proteins. *FASEB J.* 7[2], 328-338. 1993.
224. Lipkin,P.H., Davidson,D., Spivak,L., Straube,R., Rhines,J., & Chang,C.T. Neurodevelopmental and medical outcomes of persistent pulmonary hypertension in term newborns treated with nitric oxide. *J.Pediatr.* 140[3], 306-310. 2002.
225. Lipton,S.A., Choi,Y.B., Pan,Z.H., Lei,S.Z., Chen,H.S., Sucher,N.J., Loscalzo,J., Singel,D.J., & Stamler,J.S. A redox-based mechanism for the neuroprotective and neurodestructive effects of nitric oxide and related nitroso-compounds. *Nature* 364[6438], 626-632. 1993.
226. Liu,H., Goodman,J.C., & Robertson,C.S. The effects of L-arginine on cerebral hemodynamics after controlled cortical impact injury in the mouse. *J.Neurotrauma* 19[3], 327-334. 2002.
227. Lo,E.H., Hara,H., Rogowska,J., Trocha,M., Pierce,A.R., Huang,P.L., Fishman,M.C., Wolf,G.L., & Moskowitz,M.A. Temporal correlation mapping analysis of the hemodynamic penumbra in mutant mice deficient in endothelial nitric oxide synthase gene expression. *Stroke* 27[8], 1381-1385. 1996.
228. Lopes Cardozo,R.H., de Beaufort,A.J., Gesink,B.J., Moison,R.M., van de,B.M., Berger,H.M., & van Bel,F. Inhalation of nitric oxide: effect on cerebral hemodynamics and activity, and antioxidant status in the newborn lamb. *Biol.Neonate* 69[4], 284-292. 1996.
229. Ludmer,P.L., Selwyn,A.P., Shook,T.L., Wayne,R.R., Mudge,G.H., Alexander,R.W., & Ganz,P. Paradoxical vasoconstriction induced by acetylcholine in atherosclerotic coronary arteries. *N.Engl.J.Med.* 315[17], 1046-1051. 1986.
230. Lüllmann,H. & Mohr,K. *Pharmakologie und Toxikologie.* 14., 158-159. Thieme Verlag. Stuttgart . 1999.
231. Lynch,D.R. & Dawson,T.M. Secondary mechanisms in neuronal trauma. *Curr.Opin.Neurol.* 7[6], 510-516. 1994.
232. Ma,X.L., Weyrich,A.S., Lefer,D.J., & Lefer,A.M. Diminished basal nitric oxide release after myocardial ischemia and reperfusion promotes neutrophil adherence to coronary endothelium. *Circ.Res.* 72[2], 403-412. 1993.
233. Maas,A.I., Marmarou,A., Murray,G.D., & Steyerberg,E.W. Clinical trials in traumatic brain injury: current problems and future solutions. *Acta Neurochir.Suppl* 89, 113-118. 2004.
234. Maas,A.I., Steyerberg,E.W., Murray,G.D., Bullock,R., Baethmann,A., Marshall,L.F., & Teasdale,G.M. Why have recent trials of neuroprotective agents in head injury failed to show convincing efficacy? A pragmatic analysis and theoretical considerations. *Neurosurgery* 44[6], 1286-1298. 1999.
235. Macarthur,P.H., Shiva,S., & Gladwin,M.T. Measurement of circulating nitrite and S-nitrosothiols by reductive chemiluminescence. *J.Chromatogr.B Analyt.Technol.Biomed.Life Sci.* 2007.
236. Manley,G., Knudson,M.M., Morabito,D., Damron,S., Erickson,V., & Pitts,L. Hypotension, hypoxia, and head injury: frequency, duration, and consequences. *Arch.Surg.* 136[10], 1118-1123. 2001.
237. Marion,D.W., Darby,J., & Yonas,H. Acute regional cerebral blood flow changes caused by severe head injuries. *J.Neurosurg.* 74[3], 407-414. 1991.
238. Marklund,N., Bakshi,A., Castelbuono,D.J., Conte,V., & McIntosh,T.K. Evaluation of pharmacological treatment strategies in traumatic brain injury. *Curr.Pharm.Des* 12[13], 1645-1680. 2006.
239. Marmarou,A., Foda,M.A., van den,B.W., Campbell,J., Kita,H., & Demetriadou,K. A new model of diffuse brain injury in rats. Part I: Pathophysiology and biomechanics. *J.Neurosurg.* 80[2], 291-300. 1994.
240. Marmarou,A. & Shima,K. Comparative studies of edema produced by fluid percussion injury with lateral and central modes of injury in cats. *Adv.Neurol.* 52, 233-236. 1990.
241. Marsh,N. & Marsh,A. A short history of nitroglycerine and nitric oxide in pharmacology and physiology. *Clin.Exp.Pharmacol.Physiol* 27[4], 313-319. 2000.
242. Matsunaga,K. & Furchgott,R.F. Interactions of light and sodium nitrite in producing relaxation of rabbit aorta. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 248[2], 687-695. 1989.

243. May,G.R., Crook,P., Moore,P.K., & Page,C.P. The role of nitric oxide as an endogenous regulator of platelet and neutrophil activation within the pulmonary circulation of the rabbit. *Br.J.Pharmacol.* 102[3], 759-763. 1991.
244. McLaughlin,M.R. & Marion,D.W. Cerebral blood flow and vasoresponsivity within and around cerebral contusions. *J.Neurosurg.* 85[5], 871-876. 1996.
245. McMahon,T.J., Moon,R.E., Luschinger,B.P., Carraway,M.S., Stone,A.E., Stolp,B.W., Gow,A.J., Pawloski,J.R., Watke,P., Singel,D.J., Piantadosi,C.A., & Stamler,J.S. Nitric oxide in the human respiratory cycle. *Nat.Med.* 8[7], 711-717. 2002.
246. McMahon,T.J. & Stamler,J.S. Concerted nitric oxide/oxygen delivery by hemoglobin. *Methods Enzymol.* 301, 99-114. 1999.
247. Meadow,W., Benn,A., Giardini,N., Hageman,J., & Berger,S. Clinical correlates do not predict PaO2 response after tolazoline administration in hypoxic newborns. *Crit Care Med.* 14[6], 548-551. 1986.
248. Meadow,W.L. & Meus,P.J. Hemodynamic consequences of tolazoline in neonatal group B streptococcal bacteremia: an animal model. *Pediatr.Res.* 18[10], 960-965. 1984.
249. Mehta,S., Stewart,D.J., & Levy,R.D. The hypotensive effect of L-arginine is associated with increased expired nitric oxide in humans. *Chest* 109[6], 1550-1555. 1996.
250. Meixensberger,J. & Roosen,K. Clinical and pathophysiological significance of severe neurotrauma in polytraumatized patients. *Langenbecks Arch.Surg.* 383[3-4], 214-219. 1998.
251. Mendelow,A.D. & Teasdale,G.M. Pathophysiology of head injuries. *Br.J.Surg.* 70[11], 641-650. 1983.
252. Menon,D.K. Procrustes, the traumatic penumbra, and perfusion pressure targets in closed head injury. *Anesthesiology* 98[4], 805-807. 2003.
253. Menon,D.K. Procrustes, the traumatic penumbra, and perfusion pressure targets in closed head injury. *Anesthesiology* 98[4], 805-807. 2003.
254. Meurs,K.P., Rhine,W.D., Asselin,J.M., & Durand,D.J. Response of premature infants with severe respiratory failure to inhaled nitric oxide. *Preemie NO Collaborative Group. Pediatr.Pulmonol.* 24[5], 319-323. 1997.
255. Mielke,C.H., Jr., Kaneshiro,M.M., Maher,I.A., Weiner,J.M., & Rapaport,S.I. The standardized normal Ivy bleeding time and its prolongation by aspirin. *Blood* 34[2], 204-215. 1969.
256. Millar,T.M., Stevens,C.R., Benjamin,N., Eisenthal,R., Harrison,R., & Blake,D.R. Xanthine oxidoreductase catalyses the reduction of nitrates and nitrite to nitric oxide under hypoxic conditions. *FEBS Lett.* 427[2], 225-228. 1998.
257. Millar,T.M., Stevens,C.R., & Blake,D.R. Xanthine oxidase can generate nitric oxide from nitrate in ischaemia. *Biochem.Soc.Trans.* 25[3], 528S. 1997.
258. Modin,A., Bjerne,H., Herulf,M., Alving,K., Weitzberg,E., & Lundberg,J.O. Nitrite-derived nitric oxide: a possible mediator of 'acidic-metabolic' vasodilation. *Acta Physiol Scand.* 171[1], 9-16. 2001.
259. Moenkhoff,M., Schmitt,B., Wohlrab,G., Waldvogel,K., Fanconi,S., & Baenziger,O. Electroencephalogram changes during inhalation with nitric oxide in the pediatric intensive care patient--a preliminary report. *Crit Care Med.* 26[11], 1887-1892. 1998.
260. Mokri,B. The Monro-Kellie hypothesis: applications in CSF volume depletion. *Neurology* 56[12], 1746-1748. 2001.
261. Monro,J. Observations on the structures and functions of the nervous system. W.Creech Edinburgh . 1783.
262. Moulds,R.F., Jauernig,R.A., & Shaw,J. A comparison of the effects of hydralazine, diazoxide, sodium nitrite and sodium nitroprusside on human isolated arteries and veins. *Br.J.Clin.Pharmacol.* 11[1], 57-61. 1981.
263. Mumenthaler,M. & Mattle,H. *Neurologie.* 11., 80. Georg Thieme Verlag. Stuttgart . 2001.
264. Murad,F. Cyclic guanosine monophosphate as a mediator of vasodilation. *J.Clin.Invest* 78[1], 1-5. 1986.
265. Murad,F. Discovery of some of the biological effects of nitric oxide and its role in cell signaling. *Biosci.Rep.* 24[4-5], 452-474. 2004.
266. Murray,G.D., Butcher,I., McHugh,G.S., Lu,J., Mushkudiani,N.A., Maas,A.I., Marmarou,A., & Steyerberg,E.W. Multivariable prognostic analysis in traumatic brain injury: results from the IMPACT study. *J.Neurotrauma* 24[2], 329-337. 2007.
267. Neff,S. & Subramaniam,R.P. Monro-Kellie doctrine. *J.Neurosurg.* 85[6], 1195. 1996.



268. Neviere,R., Mordon,S., Marechal,X., Buys,B., Guery,B., Mathieu,D., Wattel,F., & Chopin,C. Inhaled nitric oxide modulates leukocyte kinetics in the mesenteric venules of endotoxemic rats. *Crit Care Med.* 28[4], 1072-1076. 2000.
269. Nishida,J., McCuskey,R.S., McDonnell,D., & Fox,E.S. Protective role of NO in hepatic microcirculatory dysfunction during endotoxemia. *Am.J.Physiol* 267[6 Pt 1], G1135-G1141. 1994.
270. Nissl,F. *Nervensystem.* ed. Ehrlich, P. Enzyklopädie der mikroskopischen Technik. 1919. Berlin, Urban und Schwarzenberg. 1919.
271. Niu,X.F., Smith,C.W., & Kubes,P. Intracellular oxidative stress induced by nitric oxide synthesis inhibition increases endothelial cell adhesion to neutrophils. *Circ.Res.* 74[6], 1133-1140. 1994.
272. Ohta,K., Graf,R., Rosner,G., & Heiss,W.D. Profiles of cortical tissue depolarization in cat focal cerebral ischemia in relation to calcium ion homeostasis and nitric oxide production. *J.Cereb.Blood Flow Metab* 17[11], 1170-1181. 1997.
273. Oliver,J.A. Endothelium-derived relaxing factor contributes to the regulation of endothelial permeability. *J.Cell Physiol* 151[3], 506-511. 1992.
274. Overgaard,J. & Tweed,W.A. Cerebral circulation after head injury. 1. Cerebral blood flow and its regulation after closed head injury with emphasis on clinical correlations. *J.Neurosurg.* 41[5], 531-541. 1974.
275. Palmer,R.M., Ashton,D.S., & Moncada,S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature* 333[6174], 664-666. 1988.
276. Palmer,R.M., Ferrige,A.G., & Moncada,S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 327[6122], 524-526. 1987.
277. Panter,S.S. & Faden,A.I. Pretreatment with NMDA antagonists limits release of excitatory amino acids following traumatic brain injury. *Neurosci.Lett.* 136[2], 165-168. 1992.
278. Panza,J.A., Casino,P.R., Kilcoyne,C.M., & Quyyumi,A.A. Role of endothelium-derived nitric oxide in the abnormal endothelium-dependent vascular relaxation of patients with essential hypertension. *Circulation* 87[5], 1468-1474. 1993.
279. Park,K.J., Lee,Y.J., Oh,Y.J., Lee,K.S., Sheen,S.S., & Hwang,S.C. Combined effects of inhaled nitric oxide and a recruitment maneuver in patients with acute respiratory distress syndrome. *Yonsei Med.J.* 44[2], 219-226. 2003.
280. Parker,J.O. Nitrate tolerance. *Am.J.Cardiol.* 60[15], 44H-48H. 1987.
281. Parker,J.O. Nitrate tolerance. A problem during continuous nitrate administration. *Eur.J.Clin.Pharmacol.* 38 Suppl 1, S21-S25. 1990.
282. Parmentier,S., Bohme,G.A., Lerouet,D., Damour,D., Stutzmann,J.M., Margail,I., & Plotkine,M. Selective inhibition of inducible nitric oxide synthase prevents ischaemic brain injury. *Br.J.Pharmacol.* 127[2], 546-552. 1999.
283. Patel,R.P. & Gladwin,M.T. Physiologic, pathologic and therapeutic implications for hemoglobin interactions with nitric oxide. *Free Radic.Biol.Med.* 36[4], 399-401. 2004.
284. Patel,R.P., Hogg,N., Spencer,N.Y., Kalyanaraman,B., Matalon,S., & Darley-Usmar,V.M. Biochemical characterization of human S-nitrosohemoglobin. Effects on oxygen binding and transnitrosation. *J.Biol.Chem.* 274[22], 15487-15492. 1999.
285. Peach,M.J., Singer,H.A., & Loeb,A.L. Mechanisms of endothelium-dependent vascular smooth muscle relaxation. *Biochem.Pharmacol.* 34[11], 1867-1874. 1985.
286. Pepke-Zaba,J., Higenbottam,T.W., Dinh-Xuan,A.T., Stone,D., & Wallwork,J. Inhaled nitric oxide as a cause of selective pulmonary vasodilatation in pulmonary hypertension. *Lancet* 338[8776], 1173-1174. 1991.
287. Povlishock,J.T. Traumatically induced axonal damage without concomitant change in focally related neuronal somata and dendrites. *Acta Neuropathol.(Berl)* 70[1], 53-59. 1986.
288. Quyyumi,A.A., Dakak,N., Andrews,N.P., Husain,S., Arora,S., Gilligan,D.M., Panza,J.A., & Cannon,R.O., III. Nitric oxide activity in the human coronary circulation. Impact of risk factors for coronary atherosclerosis. *J.Clin.Invest* 95[4], 1747-1755. 1995.
289. Radomski,M.W., Palmer,R.M., & Moncada,S. The role of nitric oxide and cGMP in platelet adhesion to vascular endothelium. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 148[3], 1482-1489. 1987.

290. Radomski, M.W., Palmer, R.M., & Moncada, S. An L-arginine/nitric oxide pathway present in human platelets regulates aggregation. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 87[13], 5193-5197. 1990.
291. Rassaf, T., Bryan, N.S., Kelm, M., & Feelisch, M. Concomitant presence of N-nitroso and S-nitroso proteins in human plasma. *Free Radic.Biol.Med.* 33[11], 1590-1596. 2002.
292. Rassaf, T., Bryan, N.S., Maloney, R.E., Specian, V., Kelm, M., Kalyanaraman, B., Rodriguez, J., & Feelisch, M. NO adducts in mammalian red blood cells: too much or too little? *Nat.Med.* 9[5], 481-482. 2003.
293. Rassaf, T., Feelisch, M., & Kelm, M. Circulating NO pool: assessment of nitrite and nitroso species in blood and tissues. *Free Radic.Biol.Med.* 36[4], 413-422. 2004.
294. Rassaf, T., Preik, M., Kleinbongard, P., Lauer, T., Heiss, C., Strauer, B.E., Feelisch, M., & Kelm, M. Evidence for in vivo transport of bioactive nitric oxide in human plasma. *J.Clin.Invest* 109[9], 1241-1248. 2002.
295. Rengasamy, A. & Johns, R.A. Characterization of endothelium-derived relaxing factor/nitric oxide synthase from bovine cerebellum and mechanism of modulation by high and low oxygen tensions. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 259[1], 310-316. 1991.
296. Reutens, D.C., McHugh, M.D., Toussaint, P.J., Evans, A.C., Gjedde, A., Meyer, E., & Stewart, D.J. L-arginine infusion increases basal but not activated cerebral blood flow in humans. *J.Cereb.Blood Flow Metab* 17[3], 309-315. 1997.
297. Rhodes, P., Leone, A.M., Francis, P.L., Struthers, A.D., Moncada, S., & Rhodes PM [corrected to Rhodes. The L-arginine:nitric oxide pathway is the major source of plasma nitrite in fasted humans. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 209[2], 590-596. 1995.
298. Ribas, G.C. & Jane, J.A. Traumatic contusions and intracerebral hematomas. *J.Neurotrauma* 9 Suppl 1, S265-S278. 1992.
299. Rimar, S. & Gillis, C.N. Selective pulmonary vasodilation by inhaled nitric oxide is due to hemoglobin inactivation. *Circulation* 88[6], 2884-2887. 1993.
300. Rimensberger, P.C., Spahr-Schopfer, I., Berner, M., Jaeggi, E., Kalangos, A., Friedli, B., & Beghetti, M. Inhaled nitric oxide versus aerosolized iloprost in secondary pulmonary hypertension in children with congenital heart disease: vasodilator capacity and cellular mechanisms. *Circulation* 103[4], 544-548. 2001.
301. Rinecker, M., Plesnila, N., Baethmann, A., & Stoffel, M. Secondary growth of a cortical necrosis: effect of NOS inhibition by aminoguanidine post insult. *Acta Neurochir.(Wien.)* 145[11], 977-981. 2003.
302. Roberts, J.D., Jr., Fineman, J.R., Morin, F.C., III, Shaul, P.W., Rimar, S., Schreiber, M.D., Polin, R.A., Zwass, M.S., Zayek, M.M., Gross, I., Heymann, M.A., & Zapol, W.M. Inhaled nitric oxide and persistent pulmonary hypertension of the newborn. The Inhaled Nitric Oxide Study Group. *N.Engl.J.Med.* 336[9], 605-610. 1997.
303. Roberts, J.D., Jr., Lang, P., Bigatello, L.M., Vlahakes, G.J., & Zapol, W.M. Inhaled nitric oxide in congenital heart disease. *Circulation* 87[2], 447-453. 1993.
304. Roberts, J.D., Polaner, D.M., Lang, P., & Zapol, W.M. Inhaled nitric oxide in persistent pulmonary hypertension of the newborn. *Lancet* 340[8823], 818-819. 1992.
305. Rogers, N.E. & Ignarro, L.J. Constitutive nitric oxide synthase from cerebellum is reversibly inhibited by nitric oxide formed from L-arginine. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 189[1], 242-249. 1992.
306. Rosenberg, A.A., Kenneough, J.M., Moreland, S.G., Fashaw, L.M., Hale, K.A., Torielli, F.M., Abman, S.H., & Kinsella, J.P. Longitudinal follow-up of a cohort of newborn infants treated with inhaled nitric oxide for persistent pulmonary hypertension. *J.Pediatr.* 131[1 Pt 1], 70-75. 1997.
307. Rossaint, R., Falke, K.J., Lopez, F., Slama, K., Pison, U., & Zapol, W.M. Inhaled nitric oxide for the adult respiratory distress syndrome. *N.Engl.J.Med.* 328[6], 399-405. 1993.
308. Rossitch E Jr, Alexander, E., III, Black, P.M., & Cooke, J.P. L-arginine normalizes endothelial function in cerebral vessels from hypercholesterolemic rabbits. *J.Clin.Invest* 87[4], 1295-1299. 1991.
309. Rovira, I., Chen, T.Y., Winkler, M., Kawai, N., Bloch, K.D., & Zapol, W.M. Effects of inhaled nitric oxide on pulmonary hemodynamics and gas exchange in an ovine model of ARDS. *J.Appl.Physiol* 76[1], 345-355. 1994.
310. Rudinsky, B. & Meadow, W. Hemodynamic effects of combining epinephrine with nitroglycerin or nitroprusside during group B streptococcal sepsis in piglets. *Am.J.Perinatol.* 9[5-6], 435-440. 1992.
311. Rudinsky, B.F., Komar, K.J., Strates, E., & Meadow, W.L. Neither nitroglycerin nor nitroprusside selectively reduces sepsis-induced pulmonary hypertension in piglets. *Crit Care Med.* 15[12], 1127-1130. 1987.

312. Sahuquillo,J., Poca,M.A., & Amoros,S. Current aspects of pathophysiology and cell dysfunction after severe head injury. *Curr.Pharm.Des* 7[15], 1475-1503. 2001.
313. Sakamoto,K.I., Fujisawa,H., Koizumi,H., Tsuchida,E., Ito,H., Sadamitsu,D., & Maekawa,T. Effects of mild hypothermia on nitric oxide synthesis following contusion trauma in the rat. *J.Neurotrauma* 14[5], 349-353. 1997.
314. Sakurada,O., Kennedy,C., Jehle,J., Brown,J.D., Carbin,G.L., & Sokoloff,L. Measurement of local cerebral blood flow with iodo [<sup>14</sup>C] antipyrine. *Am.J.Physiol* 234[1], H59-H66. 1978.
315. Samama,C.M., Diaby,M., Fellahi,J.L., Mdhafar,A., Eyraud,D., Arock,M., Guillosson,J.J., Coriat,P., & Rouby,J.J. Inhibition of platelet aggregation by inhaled nitric oxide in patients with acute respiratory distress syndrome. *Anesthesiology* 83[1], 56-65. 1995.
316. Sato,E., Simpson,K.L., Grisham,M.B., Koyama,S., & Robbins,R.A. Inhibition of MIP-1alpha-induced human neutrophil and monocyte chemotactic activity by reactive oxygen and nitrogen metabolites. *J.Lab Clin.Med.* 135[2], 161-169. 2000.
317. Schechter,A.N., Gladwin,M.T., & Cannon,R.O., III. NO solutions? *J.Clin.Invest* 109[9], 1149-1151. 2002.
318. Schroder,M.L., Muizelaar,J.P., Bullock,M.R., Salvant,J.B., & Povlishock,J.T. Focal ischemia due to traumatic contusions documented by stable xenon-CT and ultrastructural studies. *J.Neurosurg.* 82[6], 966-971. 1995.
319. Schroder,M.L., Muizelaar,J.P., Kuta,A.J., & Choi,S.C. Thresholds for cerebral ischemia after severe head injury: relationship with late CT findings and outcome. *J.Neurotrauma* 13[1], 17-23. 1996.
320. Schuhmann,M.U., Stiller,D., Skardelly,M., Bernarding,J., Klinge,P.M., Samii,A., Samii,M., & Brinker,T. Metabolic changes in the vicinity of brain contusions: a proton magnetic resonance spectroscopy and histology study. *J.Neurotrauma* 20[8], 725-743. 2003.
321. Sheehy,A.M., Burson,M.A., & Black,S.M. Nitric oxide exposure inhibits endothelial NOS activity but not gene expression: a role for superoxide. *Am.J.Physiol* 274[5 Pt 1], L833-L841. 1998.
322. Shibata,M., Araki,N., Hamada,J., Sasaki,T., Shimazu,K., & Fukuuchi,Y. Brain nitrite production during global ischemia and reperfusion: an in vivo microdialysis study. *Brain Res.* 734[1-2], 86-90. 1996.
323. Shima,K. & Marmarou,A. Evaluation of brain-stem dysfunction following severe fluid-percussion head injury to the cat. *J.Neurosurg.* 74[2], 270-277. 1991.
324. Shimokawa,H., Kim,P., & Vanhoutte,P.M. Endothelium-dependent relaxation to aggregating platelets in isolated basilar arteries of control and hypercholesterolemic pigs. *Circ.Res.* 63[3], 604-612. 1988.
325. Siesjo,B.K. Pathophysiology and treatment of focal cerebral ischemia. Part I: Pathophysiology. *J.Neurosurg.* 77[2], 169-184. 1992.
326. Siesjo,B.K. Basic mechanisms of traumatic brain damage. *Ann.Emerg.Med* 22[6], 959-969. 1993.
327. Smith,D.H., Meaney,D.F., & Shull,W.H. Diffuse axonal injury in head trauma. *J.Head Trauma Rehabil.* 18[4], 307-316. 2003.
328. Smith,D.H., Soares,H.D., Pierce,J.S., Perlman,K.G., Saatman,K.E., Meaney,D.F., Dixon,C.E., & McIntosh,T.K. A model of parasagittal controlled cortical impact in the mouse: cognitive and histopathologic effects. *J.Neurotrauma* 12[2], 169-178. 1995.
329. Smith,S.L., Andrus,P.K., Zhang,J.R., & Hall,E.D. Direct measurement of hydroxyl radicals, lipid peroxidation, and blood-brain barrier disruption following unilateral cortical impact head injury in the rat. *J.Neurotrauma* 11[4], 393-404. 1994.
330. Soifer,S.J., Clyman,R.I., & Heymann,M.A. Effects of prostaglandin D2 on pulmonary arterial pressure and oxygenation in newborn infants with persistent pulmonary hypertension. *J.Pediatr.* 112[5], 774-777. 1988.
331. Sorlie,M., Gorren,A.C., Marchal,S., Shimizu,T., Lange,R., Andersson,K.K., & Mayer,B. Single-turnover of nitric-oxide synthase in the presence of 4-amino-tetrahydrobiopterin: proposed role for tetrahydrobiopterin as a proton donor. *J.Biol.Chem.* 278[49], 48602-48610. 2003.
332. Soukup,J., Zauner,A., Doppenberg,E.M., Menzel,M., Gilman,C., Young,H.F., & Bullock,R. The importance of brain temperature in patients after severe head injury: relationship to intracranial pressure, cerebral perfusion pressure, cerebral blood flow, and outcome. *J.Neurotrauma* 19[5], 559-571. 2002.
333. Spalding,M.B., Ala-Kokko,T.I., Kiviluoma,K., Alahuhta,S., & Juvonen,T. Inhaled nitric oxide effectively decreases right heart afterload following right heart infarct in pigs. *Scand.Cardiovasc.J.* 35[1], 45-49. 2001.

334. Stamler, J.S., Jaraki, O., Osborne, J., Simon, D.I., Keane, J., Vita, J., Singel, D., Valeri, C.R., & Loscalzo, J. Nitric oxide circulates in mammalian plasma primarily as an S-nitroso adduct of serum albumin. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 89[16], 7674-7677. 1992.
335. Stamler, J.S., Jia, L., Eu, J.P., McMahon, T.J., Demchenko, I.T., Bonaventura, J., Gernert, K., & Piantadosi, C.A. Blood flow regulation by S-nitrosohemoglobin in the physiological oxygen gradient. *Science* 276[5321], 2034-2037. 1997.
336. Stamler, J.S. & Loscalzo, J. The antiplatelet effects of organic nitrates and related nitroso compounds in vitro and in vivo and their relevance to cardiovascular disorders. *J.Am.Coll.Cardiol.* 18[6], 1529-1536. 1991.
337. Stamler, J.S., Simon, D.I., Osborne, J.A., Mullins, M.E., Jaraki, O., Michel, T., Singel, D.J., & Loscalzo, J. S-nitrosylation of proteins with nitric oxide: synthesis and characterization of biologically active compounds. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 89[1], 444-448. 1992.
338. Stamler, J.S., Singel, D.J., & Loscalzo, J. Biochemistry of nitric oxide and its redox-activated forms. *Science* 258[5090], 1898-1902. 1992.
339. Stern, M.D. In vivo evaluation of microcirculation by coherent light scattering. *Nature* 254[5495], 56-58. 1975.
340. Stern, W.E. Intracranial fluid dynamics: The relationship of intracranial pressure to the Monroe-Kellie-Doctrine and the reliability of pressure assessment. *J.R.Coll.Surg.Edinb.* 168, 18-36. 1963.
341. Stevenson, D.K., Kasting, D.S., Darnall, R.A., Jr., Ariagno, R.L., Johnson, J.D., Malachowski, N., Beets, C.L., & Sunshine, P. Refractory hypoxemia associated with neonatal pulmonary disease: the use and limitations of tolazoline. *J.Pediatr.* 95[4], 595-599. 1979.
342. Stiefel, M.F., Tomita, Y., & Marmarou, A. Secondary ischemia impairing the restoration of ion homeostasis following traumatic brain injury. *J.Neurosurg.* 103[4], 707-714. 2005.
343. Stiefel, M.F., Tomita, Y., & Marmarou, A. Secondary ischemia impairing the restoration of ion homeostasis following traumatic brain injury. *J.Neurosurg.* 103[4], 707-714. 2005.
344. Stoffel, M., Rinecker, M., Plesnila, N., Eriskat, J., & Baethmann, A. Attenuation of secondary lesion growth in the brain after trauma by selective inhibition of the inducible NO-synthase. *Acta Neurochir.Suppl* 76, 357-358. 2000.
345. Stossek, K., Lubbers, D.W., & Cottin, N. Determination of local blood flow (microflow) by electrochemically generated hydrogen. Construction and application of the measuring probe. *Pflugers Arch.* 348[3], 225-238. 1974.
346. Strich, S.J. Diffuse degeneration of the cerebral white matter in severe dementia following head injury. *J.Neurol.Neurosurg.Psychiatry* 19[3], 163-185. 1956.
347. STRICH, S.J. Lesions in the cerebral hemispheres after blunt head injury. *J.Clin.Pathol.Suppl (R.Coll.Pathol.)* 4, 166-171. 1970.
348. Sugimura, T., Sako, K., Tohyama, Y., & Yonemasu, Y. Consecutive in vivo measurement of nitric oxide in transient forebrain ischemic rat under normothermia and hypothermia. *Brain Res.* 808[2], 313-316. 1998.
349. Sundt, T.M., Jr., Sharbrough, F.W., Anderson, R.E., & Michenfelder, J.D. Cerebral blood flow measurements and electroencephalograms during carotid endarterectomy. *J.Neurosurg.* 41[3], 310-320. 1974.
350. Symon, L. The concept of intracerebral steal. *Int.Anesthesiol.Clin.* 7[3], 597-615. 1969.
351. Symonds, C.P. The differential diagnosis and treatment of cerebral states consequent upon head injuries. *British Journal of Medicine* 4, 829-832. 1928.
352. Szold, O., Khoury, W., Biderman, P., Klausner, J.M., Halpern, P., & Weinbroum, A.A. Inhaled nitric oxide improves pulmonary functions following massive pulmonary embolism: a report of four patients and review of the literature. *Lung* 184[1], 1-5. 2006.
353. Taguchi, J., Abe, J., Okazaki, H., Takuwa, Y., & Kurokawa, K. L-arginine inhibits neointimal formation following balloon injury. *Life Sci.* 53[23], L387-L392. 1993.
354. Takahashi, H., Manaka, S., & Sano, K. Changes in extracellular potassium concentration in cortex and brain stem during the acute phase of experimental closed head injury. *J.Neurosurg.* 55[5], 708-717. 1981.
355. Tanaka, K. Is nitric oxide really important for regulation of the cerebral circulation? Yes or no? *Keio J.Med.* 45[1], 14-27. 1996.
356. Tanaka, K., Fukuuchi, Y., Gomi, S., Mihara, B., Shirai, T., Nogawa, S., Nozaki, H., & Nagata, E. Inhibition of nitric oxide synthesis impairs autoregulation of local cerebral blood flow in the rat. *Neuroreport* 4[3], 267-270. 1993.

357. Teasdale,G.M. & Jennett,B. Assessment of coma and impaired consciousness. *Lancet* 2[1], 81-84. 1974. Boston, Massachusetts.
358. Thadani,U. & Rodgers,T. Side effects of using nitrates to treat angina. *Expert.Opin.Drug Saf* 5[5], 667-674. 2006.
359. Thomas,D.L., Lythgoe,M.F., Calamante,F., Gadian,D.G., & Ordidge,R.J. Simultaneous noninvasive measurement of CBF and CBV using double-echo FAIR (DEFAIR). *Magn Reson.Med.* 45[5], 853-863. 2001.
360. Thomas,D.L., Lythgoe,M.F., Gadian,D.G., & Ordidge,R.J. In vivo measurement of the longitudinal relaxation time of arterial blood (T1a) in the mouse using a pulsed arterial spin labeling approach. *Magn Reson.Med.* 55[4], 943-947. 2006.
361. Thompson,H.J., Lifshitz,J., Marklund,N., Grady,M.S., Graham,D.I., Hovda,D.A., & McIntosh,T.K. Lateral fluid percussion brain injury: a 15-year review and evaluation. *J.Neurotrauma* 22[1], 42-75. 2005.
362. Todd,N.V., Picozzi,P., Crockard,A., & Russell,R.W. Duration of ischemia influences the development and resolution of ischemic brain edema. *Stroke* 17[3], 466-471. 1986.
363. Tonz,M., von Segesser,L.K., Schilling,J., Luscher,T.F., Noll,G., Leskosek,B., & Turina,M.I. Treatment of acute pulmonary hypertension with inhaled nitric oxide. *Ann.Thorac.Surg.* 58[4], 1031-1035. 1994.
364. Trojaborg,W. & Boysen,G. Relation between EEG, regional cerebral blood flow and internal carotid artery pressure during carotid endarterectomy. *Electroencephalogr.Clin.Neurophysiol.* 34[1], 61-69. 1973.
365. Troncy,E., Francoeur,M., Salazkin,I., Yang,F., Charbonneau,M., Leclerc,G., Vinay,P., & Blaise,G. Extra-pulmonary effects of inhaled nitric oxide in swine with and without phenylephrine. *Br.J.Anaesth.* 79[5], 631-640. 1997.
366. Tsai,G.E. & Gastfriend,D.R. Nitric oxide-induced motor neuron disease in a patient with alcoholism. *N.Engl.J.Med.* 332[15], 1036. 1995.
367. Tschudi,M.R., Mesaros,S., Luscher,T.F., & Malinski,T. Direct in situ measurement of nitric oxide in mesenteric resistance arteries. Increased decomposition by superoxide in hypertension. *Hypertension* 27[1], 32-35. 1996.
368. Uetsuka,S., Fujisawa,H., Yasuda,H., Shima,H., & Suzuki,M. Severe cerebral blood flow reduction inhibits nitric oxide synthesis. *J.Neurotrauma* 19[9], 1105-1116. 2002.
369. Unterberg,A.W., Stover,J., Kress,B., & Kiening,K.L. Edema and brain trauma. *Neuroscience* 129[4], 1021-1029. 2004.
370. van Dorsten,F.A., Hata,R., Maeda,K., Franke,C., Eis,M., Hossmann,K.A., & Hoehn,M. Diffusion- and perfusion-weighted MR imaging of transient focal cerebral ischaemia in mice. *NMR Biomed.* 12[8], 525-534. 1999.
371. Vavilala,M.S., Roberts,J.S., Moore,A.E., Newell,D.W., & Lam,A.M. The influence of inhaled nitric oxide on cerebral blood flow and metabolism in a child with traumatic brain injury. *Anesth.Analg.* 93[2], 351-353. 2001.
372. Verma,R.P. Respiratory distress syndrome of the newborn infant. *Obstet.Gynecol.Surv.* 50[7], 542-555. 1995.
373. von Wild,K.R. & Wenzlaff,P. Quality management in traumatic brain injury (TBI) lessons from the prospective study in 6.800 patients after acute TBI in respect of neurorehabilitation. *Acta Neurochir.Suppl* 93, 15-25. 2005.
374. Wada,K., Chatzipanteli,K., Busto,R., & Dietrich,W.D. Role of nitric oxide in traumatic brain injury in the rat. *J.Neurosurg.* 89[5], 807-818. 1998.
375. Wada,K., Chatzipanteli,K., Busto,R., & Dietrich,W.D. Effects of L-NAME and 7-NI on NOS catalytic activity and behavioral outcome after traumatic brain injury in the rat. *J.Neurotrauma* 16[3], 203-212. 1999.
376. Wada,K., Chatzipanteli,K., Kraydieh,S., Busto,R., & Dietrich,W.D. Inducible nitric oxide synthase expression after traumatic brain injury and neuroprotection with aminoguanidine treatment in rats. *Neurosurgery* 43[6], 1427-1436. 1998.
377. Wang,Q., Theard,M.A., Pelligrino,D.A., Baughman,V.L., Hoffman,W.E., Albrecht,R.F., Cwik,M., Paulson,O.B., & Lassen,N.A. Nitric oxide (NO) is an endogenous anticonvulsant but not a mediator of the increase in cerebral blood flow accompanying bicuculline-induced seizures in rats. *Brain Res.* 658[1-2], 192-198. 1994.
378. Weinberger,B., Laskin,D.L., Heck,D.E., & Laskin,J.D. The Toxicology of Inhaled Nitric Oxide. *Toxicological Sciences* 59[1], 5-16. 2001.
379. Wessel,D.L. Inhaled nitric oxide for the treatment of pulmonary hypertension before and after cardiopulmonary bypass. *Crit Care Med.* 21[9 Suppl], S344-S345. 1993.

380. Wessel,D.L., Adatia,I., Van Marter,L.J., Thompson,J.E., Kane,J.W., Stark,A.R., & Kourembanas,S. Improved oxygenation in a randomized trial of inhaled nitric oxide for persistent pulmonary hypertension of the newborn. *Pediatrics* 100[5], E7. 1997.
381. White,R.P., Deane,C., Vallance,P., & Markus,H.S. Nitric oxide synthase inhibition in humans reduces cerebral blood flow but not the hyperemic response to hypercapnia. *Stroke* 29[2], 467-472. 1998.
382. White,R.P., Vallance,P., & Markus,H.S. Effect of inhibition of nitric oxide synthase on dynamic cerebral autoregulation in humans. *Clin.Sci.(Lond)* 99[6], 555-560. 2000.
383. Williams,P.C., Stern,M.D., Bowen,P.D., Brooks,R.A., Hammock,M.K., Bowman,R.L., & Di Chiro,G. Mapping of cerebral cortical strokes in Rhesus monkeys by laser Doppler spectroscopy. *Med.Res.Eng* 13[2], 3-5. 1980.
384. Winchell,R.J. & Hoyt,D.B. Endotracheal intubation in the field improves survival in patients with severe head injury. *Trauma Research and Education Foundation of San Diego. Arch.Surg.* 132[6], 592-597. 1997.
385. Wink,D.A. & Mitchell,J.B. Chemical biology of nitric oxide: Insights into regulatory, cytotoxic, and cytoprotective mechanisms of nitric oxide. *Free Radic.Biol.Med.* 25[4-5], 434-456. 1998.
386. Wolzt,M., MacAllister,R.J., Davis,D., Feelisch,M., Moncada,S., Vallance,P., & Hobbs,A.J. Biochemical characterization of S-nitrosohemoglobin. Mechanisms underlying synthesis, no release, and biological activity. *J.Biol.Chem.* 274[41], 28983-28990. 1999.
387. Yamada,M., Huang,Z., Dalkara,T., Endres,M., Laufs,U., Waeber,C., Huang,P.L., Liao,J.K., & Moskowitz,M.A. Endothelial nitric oxide synthase-dependent cerebral blood flow augmentation by L-arginine after chronic statin treatment. *J.Cereb.Blood Flow Metab* 20[4], 709-717. 2000.
388. Yee,S.H., Jerabek,P.A., & Fox,P.T. Non-invasive quantification of cerebral blood flow for rats by microPET imaging of <sup>15</sup>O labelled water: the application of a cardiac time-activity curve for the tracer arterial input function. *Nucl.Med.Commun.* 26[10], 903-911. 2005.
389. Yoshida,T., Waeber,C., Huang,Z., & Moskowitz,M.A. Induction of nitric oxide synthase activity in rodent brain following middle cerebral artery occlusion. *Neurosci.Lett.* 194[3], 214-218. 1995.
390. Zeller,F.P. Tolerance to organic nitrates in ischemic heart disease. *Drug Intell.Clin.Pharm.* 21[11], 857-864. 1987.
391. Zhang,Z., Naughton,D., Winyard,P.G., Benjamin,N., Blake,D.R., & Symons,M.C. Generation of nitric oxide by a nitrite reductase activity of xanthine oxidase: a potential pathway for nitric oxide formation in the absence of nitric oxide synthase activity. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 249[3], 767-772. 1998.
392. Zhang,Z.G., Chopp,M., Bailey,F., & Malinski,T. Nitric oxide changes in the rat brain after transient middle cerebral artery occlusion. *J.Neurol.Sci.* 128[1], 22-27. 1995.
393. Zhao,X., Ross,M.E., & Iadecola,C. L-Arginine increases ischemic injury in wild-type mice but not in iNOS-deficient mice. *Brain Res.* 966[2], 308-311. 2003.
394. Zweckberger,K., Eros,C., Zimmermann,R., Kim,S.W., Engel,D., & Plesnila,N. Effect of early and delayed decompressive craniectomy on secondary brain damage after controlled cortical impact in mice. *J.Neurotrauma* 23[7], 1083-1093. 2006.
395. Zweckberger,K., Stoffel,M., Baethmann,A., & Plesnila,N. Effect of decompression craniotomy on increase of contusion volume and functional outcome after controlled cortical impact in mice. *J.Neurotrauma* 20[12], 1307-1314. 2003.
396. Zweier,J.L., Samouilov,A., & Kuppusamy,P. Non-enzymatic nitric oxide synthesis in biological systems. *Biochim.Biophys.Acta* 1411[2-3], 250-262. 1999.
397. Zweier,J.L., Wang,P., & Kuppusamy,P. Direct measurement of nitric oxide generation in the ischemic heart using electron paramagnetic resonance spectroscopy. *J.Biol.Chem.* 270[1], 304-307. 1995.
398. Zweier,J.L., Wang,P., Samouilov,A., & Kuppusamy,P. Enzyme-independent formation of nitric oxide in biological tissues. *Nat.Med.* 1[8], 804-809. 1995.

## **7 Bereits veröffentlichte Aspekte der Arbeit**

### **Vorträge:**

*Die Wirkung der NO - Inhalation nach CCI - Trauma der Maus*

Vortrag im Rahmen des Kolloquiums des DFG - Graduierten - Kollegs

„Neurotraumatologie und neuropsychologische Rehabilitation“ am 24. 11.2003

*Inhaled nitric oxide increases cerebral blood flow and reduces ICP after experimental TBI in mice*

30. Jahrestagung der Sektion „Intrakranieller Druck, Hirnödem und

Hirndurchblutung“ der Deutschen Gesellschaft für Neurochirurgie, 15.10.2004

*NO - Inhalation nach experimentellem Schädelhirntrauma*

Kolloquium des Instituts für chirurgische Forschung der LMU München, 10.02.2005

### **Posterpräsentationen:**

*Inhaled nitric oxide increases cerebral blood flow and reduces ICP after experimental TBI in mice,*

7<sup>th</sup> International Neurotrauma Symposium, Adelaide, South Australia, 13.10.2004

## 8 Lebenslauf

Nicole Terpolilli  
Landwehrstr. 8  
80336 München  
nicole.terpolilli@gmail.com

### Persönliche Daten:

Geburtsdatum: 7. November 1980 in München  
Staatsangehörigkeit: Deutsch, Italienisch  
Eltern: Tonino Terpolilli, Ingenieur Elektrotechnik  
Ingrid Heinrich- Terpolilli, Gymnasiallehrerin

### Schulbildung:

1991 – 1999 Dante Gymnasium, München (9.Klasse übersprungen)  
09/1996 – 10/ 1996 Schulaufenthalt in Boston, Massachusetts  
03/1998 Schulaufenthalt in London  
1999 Allgemeine Hochschulreife (Note 1,1)

### Hochschulausbildung:

ab WS 1999/2000 Studium der Humanmedizin an der  
Ludwig-Maximilians-Universität, München  
08/2001 Physikum (Note: 2,0)  
09/2002 1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Note 2,0)  
09/2004 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Note 1,0)  
06/2006 3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Note 1,0)

ab WS 1999/ 2000 Studium der Philosophie an der Hochschule für Philosophie,  
München (Grundstudium, 5 Semester, Baccalaureat der  
Philosophie)

### Famulaturen:

02/ 2002 Famulatur in der Inneren Medizin, Medizinische Poliklinik des Klinikums  
Innenstadt, München

04/2002 Teilnahme am IPOKRATES- Seminar „Symptoms, Signs &  
Interpretation in Neurology“, Städtisches Krankenhaus Harlaching,  
München, Leitung: Prof. M. Rathbone, McMaster University, Hamilton,  
ON, Kanada

10/2002 Famulatur in der Allgemein- und Suchtmedizin, Praxis Fr. Dr. A.  
Hummel, Fürstenfeldbruck

02/2003 Famulatur in der allgemeinen- und Unfallchirurgie, Praxis Dres. Gerber  
und Baumgartl, München

03/2003 Famulatur in der Inneren Medizin, Ospedale Fatebenfratelli, Isola  
Tiberina, Rom

02/2004 Famulatur in der Neurochirurgie, Klinikum Großhadern, München



**Praktisches Jahr:**

**1. Tertial Innere Medizin**

18.04. – 07.08.2005  
Medizinische Klinik I und II  
Klinikum Großhadern, München

**2. Tertial Neurologie**

08.08.2005 – 25.09.2005  
Department of Neurology  
Henderson General Hospital  
McMaster University  
Hamilton, ON, Canada

03.10. – 27.11.2005  
Neurologische Klinik und Poliklinik  
Klinikum Großhadern, München

**3. Tertial Chirurgie**

28.11.2005 – 22.01.2006  
Chirurgische Klinik und Poliklinik  
Klinikum Großhadern, München

23.1. – 19.3.2006  
Department of Neurosurgery  
Kyoto University Hospital  
Kyoto University Graduate School of Medicine  
Kyoto, Japan

**Fremdsprachen:**

Englisch  
Italienisch  
Latein

**Beruf :**

01.08.2007 – 31.01.2007  
Wissenschaftliche Mitarbeiterin im  
Institut für Chirurgische Forschung der Ludwig – Maximilians –  
Universität München

seit 01.02.2007  
Assistenzärztin der Neurochirurgischen Klinik und  
Poliklinik, Klinikum Großhadern, München  
Leiter: Prof. J.-C. Tonn

## 9 Danksagung

Diese Arbeit wurde im Institut für Chirurgische Forschung, kommissarischer Leiter Prof. U. Pohl, in der Arbeitsgruppe Experimentelle Neurochirurgie unter der Leitung von Prof. A. Baethmann angefertigt. Betreut wurde die Studie von Herrn Prof. N. Plesnila.

Mein Dank gilt zu allererst Herrn Prof. Plesnila für die Überlassung des Themas und die exzellente Betreuung in allen wissenschaftlichen Fragen.

Herrn Baethmann danke ich für die herzliche Aufnahme in die Arbeitsgruppe.

Diese Arbeit wäre nur schlecht möglich gewesen ohne die tatkräftige Hilfe und Unterstützung von Serge Thal und „Master Surgeon“ Seong Woong Kim, die mir in NO - und allen anderen Notlagen zur Seite standen.

Für die Einarbeitung in das Traumamodell und in andere Mess - und Operationstechniken danke ich meinen Trauma - Mitdoktoranden, vor allem Klaus Zweckberger und Louisa von Baumgarten.

Vielen Dank auch an die technischen Assistentinnen Frau Uta Mamrak, Frau Veronika Bischoff und Frau Alke Schropp.

Zuletzt möchte ich mich ganz herzlich bei Frau Dr. Sabine Weiß für das Korrekturlesen des Manuskripts und bei Herrn Tim Kolbet für die Unterstützung im Allgemeinen und bei graphischen Fragen bedanken.