

Aus der Neurochirurgischen Klinik und Poliklinik der Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. J.C. Tonn

und dem

Institut für Chirurgische Forschung im Walter-Brendel-Zentrum für experimentelle Medizin

der Ludwig-Maximilians-Universität München

unter der Leitung von Prof. Dr. med. U. Pohl

Die Bedeutung sowohl von Bradykinin B1 und B2 Rezeptoren als auch von Matrix
Metalloproteinase-9 für die Entstehung des sekundären Hirnschadens nach experimenteller
Subarachnoidalblutung in der Maus

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Stephanie Anetsberger

aus

Vilshofen

2014

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Nikolaus Plesnila

Mitberichterstatter: PD. Dr. med. Karsten Schöller

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 18. Dezember 2014

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung.....	7
1.1 Einführung in die Subarachnoidalblutung.....	7
1.1.1 Ätiologie.....	7
1.1.2 Epidemiologie.....	7
1.1.3 Klinik.....	8
1.1.4 Einteilung der Subarachnoidalblutung.....	8
1.1.5 Diagnostik.....	9
1.1.6 Therapie.....	10
1.1.7 Pathophysiologie der Subarachnoidalblutung.....	11
1.1.7.1 ICP, CPP und CBF.....	11
1.1.7.2 Der frühe Hirnschaden nach SAB.....	12
1.1.7.3 Die Blut-Hirn-Schranke.....	13
1.1.7.4 Das Hirnödem.....	13
1.2 Bradykinin als einer der Mediatoren des Hirnödems nach SAB.....	14
1.3 Matrix-Metalloproteinase-9.....	16
1.4 Hypothese und Fragestellung.....	17
2 Material und Methoden.....	18
2.1 Versuchstiere.....	18
2.2 Versuchsdurchführung.....	19
2.2.1 Allgemeine Versuchsbedingungen.....	19
2.2.2 Narkose.....	19
2.2.3 Intraoperatives Monitoring.....	19
2.2.3.1 Beatmung.....	19
2.2.3.2 Temperaturkontrolle.....	20
2.2.3.3 Intrakranielle Druckmessung.....	20
2.2.3.4 Laser-Doppler Fluxmetrie (LDF).....	20
2.2.4 Induktion der Subarachnoidalblutung.....	21
2.2.5 Operationsende und Narkoseausleitung.....	22
2.2.6 Datenerfassung.....	22
2.2.7 Protokolle der unterschiedlichen Versuchsgruppen.....	23
2.2.8 Postoperative Beobachtung über sieben Tage hinsichtlich Überleben, neurologischer Funktionen und Gewichtsverlauf.....	23
2.2.8.1 Neuroscore.....	24
Neuroscore Teil 1.....	24
Neuroscore Teil 2 - Modifizierter Bederson-Score.....	27
NSS Score.....	27
2.2.9 ICP Messung 24 Stunden postoperativ.....	28
2.2.10 Gravimetrische Bestimmung des Hirnwassergehalts.....	28
2.2.11 Histomorphologische Bestimmung des neuronalen Zellschadens.....	29
2.2.11.1 Histologie.....	29
2.2.11.2 Morphometrie.....	30
2.3 Statistische Datenauswertung.....	31
3 Ergebnisse.....	32
3.1 Einfluss von Bradykinin auf die Entstehung des frühen Hirnschadens nach SAB.....	32
3.2 Beobachtungen über sieben Tage nach Subarachnoidalblutung.....	32
3.2.1 Pathophysiologische Veränderungen zum Zeitpunkt der experimentellen SAB.....	32
3.2.1.1 Anstieg des intrakraniellen Druckes.....	32
3.2.1.2 Abfall der cerebralen Durchblutung.....	33
3.2.2 Postoperatives Outcome über sieben Tage.....	34

3.2.2.1	Überleben.....	34
3.2.2.2	Neurologische Funktionen.....	35
3.2.2.3	Gewichtsverlauf.....	40
3.3	Beobachtungen über 24 Stunden nach Subarachnoidalblutung.....	44
3.3.1	Pathophysiologische Veränderungen zum Zeitpunkt der experimentellen SAB.....	44
3.3.1.1	Anstieg des intrakraniellen Druckes.....	44
3.3.1.2	Abfall der cerebralen Durchblutung.....	45
3.3.2	Untersuchungen 24 Stunden nach Subarachnoidalblutung.....	46
3.3.2.1	Überleben.....	46
3.3.2.2	Neurologische Funktionen.....	46
3.3.2.3	Gewichtsverlauf.....	48
3.3.2.4	Bestimmung des ICP 24 Stunden nach Subarachnoidalblutung.....	49
3.3.2.5	Bestimmung des Hirnwassergehaltes 24 Stunden nach Subarachnoidalblutung.....	50
3.4	Einfluss von Matrix-Metalloproteinase-9 auf die Entstehung des frühen Hirnschadens nach Subarachnoidalblutung.....	50
3.4.1	Pathophysiologische Veränderungen zum Zeitpunkt der experimentellen SAB.....	50
3.4.1.1	Anstieg des intrakraniellen Druckes.....	50
3.4.1.2	Abfall der cerebralen Durchblutung.....	51
3.4.2	Postoperatives Outcome über sieben Tage nach Subarachnoidalblutung.....	53
3.4.2.1	Überleben.....	53
3.4.2.2	Neurologische Funktionen.....	53
3.4.2.3	Gewichtsverlauf.....	57
3.4.3	Beobachtungen über 24 Stunden nach Subarachnoidalblutung.....	60
3.4.3.1	Überleben.....	60
3.4.3.2	Neurologische Funktionen.....	61
3.4.3.3	Gewichtsverlauf.....	62
3.4.3.4	Bestimmung des ICP 24 Stunden nach Subarachnoidalblutung.....	62
3.4.3.5	Bestimmung des Hirnwassergehaltes 24 Stunden nach Subarachnoidalblutung.....	63
4	Diskussion.....	64
4.1.1	Früher Hirnschaden nach Subarachnoidalblutung.....	64
4.1.2	Zusammenbruch der Blut-Hirn-Schranke und Entstehung eines Hirnödems.....	64
4.1.3	Nachweis des Kallikrein-Kinin Systems im ZNS und Bedeutung bei pathophysiologischen Prozessen.....	66
4.1.4	Rolle von Bradykinin und seiner Rezeptoren für die Pathologie nach SAB.....	67
4.1.5	Nachweis von MMP-9 im ZNS und Bedeutung bei pathophysiologischen Prozessen.....	68
4.1.6	Blut-Hirn Schrankenstörung und Ausbildung eines Hirnödems nach SAB.....	70
4.2	Diskussion der Methoden.....	71
4.2.1	Verwendung eines Tiermodells.....	71
4.2.2	Auswahl der Versuchstiere.....	71
4.2.3	Anästhesie.....	72
4.2.4	Modell zur Induktion der Subarachnoidalblutung.....	74
4.2.5	Intrakranielle Druckmessung.....	75
4.2.6	Laser-Doppler Fluxmetrie.....	76
4.2.7	Erhebung des neurologischen Status.....	76
4.2.8	Gravimetrische Ödembestimmung.....	77
4.2.9	Histologie.....	78
4.2.10	Zeitliche Verläufe der MMP-9 Aktivierung nach unterschiedlichen ZNS Pathologien.....	78
4.3	Diskussion der Ergebnisse.....	79
4.3.1	Intrakranieller Druck.....	79
4.3.2	Letalität.....	80

4.3.3 Neurologische Funktionen.....	81
4.3.4 Gewicht.....	83
4.3.5 Der intrakranielle Druck 24 Stunden nach SAB Induktion	85
4.3.6 Das cerebrale Ödem 24 Stunden nach SAB.....	85
4.3.7 Zellschaden/Morphometrie.....	86
4.3.8 Einfluss von MMP-9 auf den Untergang der Neurone im Hippocampus.....	86
5 Zusammenfassung.....	88
6 Literaturverzeichnis.....	91
7 Danksagung.....	110
8 Bisher veröffentlichte Teilaspekte der Arbeit.....	111

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Aktivierung des Kallikrein-Kinin Systems.....	15
Abbildung 2: ICP- Verlauf der B1-/-, B2-/- und C57/Bl6-Mäuse, die über 7 Tage beobachtet wurden. Der Zeitpunkt „0“ markiert die Induktion der SAB.....	33
Abbildung 3: Überlebenszeit der B1-/-, B2-/- und C57/Bl6-Mäuse.....	35
Abbildung 4: Neuroscore aller B1-/-, B2-/- und C57/Bl6-Mäuse über 7 Tage.....	36
Abbildung 5: Neuroscore der den Beobachtungszeitraum überlebenden B2-/- und C57/Bl6-Mäuse	37
Abbildung 6: Neuroscore der während des Beobachtungszeitraumes verstorbenen B1-/-, B2-/- und C57/Bl6-Mäuse. In dieser graphischen Darstellung steht der Tag „0“ für den Tag, an dem die Mäuse verstorben sind.....	39
Abbildung 7: Gewichtsverlauf der B1-/-, B2-/- und C57/Bl6-Mäuse prozentual zum Ausgangsgewicht.....	41
Abbildung 8: Gewichtsverlauf der B1-/-, B2-/- und C57/Bl6-Mäuse prozentual zum Vortag.....	42
Abbildung 9: Gewichtsverlauf während des Beobachtungszeitraumes verstorbener B1-/-, B2-/- und C57/Bl6- Mäuse.....	43
Abbildung 10: ICP-Verlauf der B1-/-, B2-/- und C57/Bl6-Mäuse, deren Gehirne zur Ödembestimmung entnommen wurden. Der Zeitpunkt "0" markiert die Induktion der SAB.....	44
Abbildung 11: Cerebraler Blutfluss der B1-/-, B2-/- und C57/Bl6-Mäuse, deren Gehirne zur Ödembestimmung entnommen wurden. Der Zeitpunkt "0" markiert die Induktion der SAB.....	46
Abbildung 12: Neuroscore der B1-/-, B2-/- und C57/Bl6-Mäuse nach 24 Stunden.....	48
Abbildung 13: Bederson-Score der B1-/-, B2-/- und C57/Bl6-Mäuse nach 24 Stunden.....	48
Abbildung 14: ICP-Verlauf der B1-/-, B2-/- und C57/Bl6-Mäuse 24 Stunden nach Induktion der SAB.....	49
Abbildung 15: ICP-Verlauf der MMP-9-/-Mäuse und ihrer Kontrollen. Der Zeitpunkt "0" markiert die Induktion der SAB.....	51
Abbildung 16: Cerebraler Blutfluss der MMP-9-/- Mäuse und ihrer Kontrollen prozentual zum Ausgangswert. Der Zeitpunkt "0" markiert die Induktion der SAB.....	52
Abbildung 17: Überlebenskurve der MMP-9-/- Mäuse und ihrer Kontrollen.....	53
Abbildung 18: Neuroscore und NSS-Score der MMP-9-/- Mäuse und ihrer Kontrollen über 7 Tage	56
Abbildung 19: Bederson-Score der MMP-9-/- Mäuse und ihrer Kontrollen über 7 Tage.....	57
Abbildung 20: Gewichtsverlauf der MMP-9-/- Mäuse und ihrer Kontrollen prozentual zum Ausgangsgewicht.....	59
Abbildung 21: Gewichtsverlauf der MMP-9-/- Mäuse und ihrer Kontrollen prozentual zum Vortag	60
Abbildung 22: Neuroscore der MMP-9-/- Mäuse und ihrer Kontrollen 24 Stunden nach Induktion der SAB.....	61
Abbildung 23: Bederson-Score der MMP-9-/- Mäuse und ihrer Kontrollen 24 Stunden nach Induktion der SAB.....	62
Abbildung 24: ICP-Verlauf der MMP-9-/- Mäuse und ihrer Kontrollen 24 Stunden nach Induktion der SAB.....	63

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Klinische Einteilung der Subarachnoidalblutung: Hunt-& Hess-Skala, WFNS Score.....	9
Tabelle 2: Einteilung der Subarachnoidalblutung im CCT nach Fisher.....	9
Tabelle 3: Auflistung der einzelnen Versuchsgruppen mit Tierstamm und Versuchsaufbau.....	23
Tabelle 4: Neuroscore zur Beurteilung von Bewusstsein, Verhalten, Atmung, Motorik und Sensorik	27
Tabelle 5: Modifizierter Bederson-Score zur Beurteilung der motorischen Aktivität.....	27
Tabelle 6: Ergebnisse des Neuroscores der den Beobachtungszeitraum überlebenden Tiere.....	54
Tabelle 7: Ergebnisse des NSS Scores der den Beobachtungszeitraum überlebenden Tiere.....	54
Tabelle 8: Ergebnisse des Bederson-Scores der den Beobachtungszeitraum überlebenden Tiere.....	55
Tabelle 9: Vasoaktive Substanzen, die eine Erhöhung der Blut-Hirn-Schranken Permeabilität bedingen.....	66

1 Einleitung

1.1 Einführung in die Subarachnoidalblutung

1.1.1 Ätiologie

Als Subarachnoidalblutung (SAB) wird eine Blutung in den äusseren Liquorräumen, zwischen Arachnoidea und Pia mater bezeichnet. Der Großteil der Subarachnoidalblutungen ist traumatisch bedingt, die häufigste, nicht traumatische Ursache einer spontanen Subarachnoidalblutung ist in ca. 75-80% ein rupturiertes intrakranielles Aneurysma^{76,236}. Selten wird eine spontane SAB durch eine vaskuläre Malformation, eine arterielle Dissektion, einen oberflächlichen Tumor oder eine entzündliche Gefäßerkrankung ausgelöst. In etwa 20% kann keine Ursache für die Subarachnoidalblutung gefunden werden. In einem solchen Fall ist die Blutung meistens deutlich geringer ausgeprägt als es eine aneurysmatische Blutung wäre, außerdem gestaltet sich die Blutverteilung anders. Typischerweise findet man bei dieser Art der Subarachnoidalblutung ohne Aneurysmanachweis Blut in der Cisterna interpeduncularis und um den Hirnstamm herum. Es handelt sich um eine sogenannte perimesenzephalische Blutung^{74,219}. Mikroaneurysmen, thrombosierte Aneurysmen, kleine vaskuläre Missbildungen, rupturierte subarachnoidale Arteriolen und Venen sowie angiographisch nicht sichtbare durale arterio-venöse Fisteln werden als potentielle Ursachen diskutiert. Tatsächlich ist die Prognose einer SAB ohne Nachweis einer Blutungsquelle in der Regel günstig, da es zu keiner Nachblutung kommt und die Patienten wenn überhaupt nur geringe neurologische Defizite haben⁷⁵.

1.1.2 Epidemiologie

Gemäß der aktuellen Studienlage erleiden in Industrienationen etwa 10/100.000 Einwohner und Jahr eine spontane Subarachnoidalblutung^{161,184,275}. Das entspricht ca. 8.000 neuen Patienten pro Jahr in Deutschland. Weltweit schwankt die Inzidenz der SAB ziemlich stark zwischen 2/100.000 Einwohnern und Jahr in China und 22/100.000 Einwohnern und Jahr in Finnland^{97,202}. Die Inzidenz bei Frauen ist 1,24-fach höher als bei Männern²⁰². Dieser Unterschied zwischen den Geschlechtern beginnt um das 55. Lebensjahr und steigt mit zunehmendem Lebensalter. Der Altersgipfel blutender Aneurysmen liegt zwischen dem 40. und 60. Lebensjahr. Die aneurysmatische Subarachnoidalblutung ist weltweit eine häufige Ursache für vorzeitigen Tod und Behinderung³⁶. Etwa 15 % der Menschen, die eine Subarachnoidalblutung erleiden sterben bevor sie ein Krankenhaus erreichen, 40% versterben innerhalb der ersten 30 Tage nach dem Ereignis⁹⁷.

Von den Überlebenden bleiben 30% schwer behindert³⁶.

1.1.3 Klinik

Klinische Leitsymptome einer Subarachnoidalblutung sind plötzlich einsetzender Vernichtungskopfschmerz begleitet von unterschiedlich ausgeprägter Bewusstseinsstörung und Meningismus als Zeichen der meningealen Reizung durch das Blut im Subarachnoidalraum. Prodromalsymptome einer Aneurysmaruptur mit kurzfristig passager auftretenden Cephalgien sind in 25% der Patienten mit einer Subarachnoidalblutung in der Anamnese zu erfragen.

Fokal neurologische Defizite treten nur bei bestimmten Aneurysmalokalisationen auf, beispielsweise eine Parese des III. Hirnnerven bei einem Aneurysma der A. carotis interna, oder bei Ausbildung intracerebraler Hämatome⁷⁵. Anfallsereignisse sind nur selten zu beobachten, rupturierte Aneurysmen im vorderen Stromgebiet gehen teilweise mit einem initialen Krampfereignis einher.

Vegetative Begleiterscheinungen einer SAB umfassen Schwitzen, Flush, Erbrechen und einen Blutdruckanstieg. Diese Symptome geben oft Anlass zu Fehldiagnosen. Im EKG fallen Herzrhythmusstörungen auf, die zur Fehldiagnose Myokardischämie führen können¹¹⁷. Diese EKG Veränderungen sind durch eine erhöhte Katecholaminausschüttung ausgelöst und bilden sich in der Regel innerhalb weniger Tage zurück.

In ca. 8-15% tritt nach SAB eine Glaskörperblutung auf (Terson Syndrom)¹⁵⁴.

Fieber und einen Leukozytenanstieg in den ersten Tagen nach SAB findet man in erster Linie beim Vorliegen einer intraventrikulären Blutung oder bei sich entwickelnden Vasospasmen.

1.1.4 Einteilung der Subarachnoidalblutung

Zur Einteilung der Subarachnoidalblutung in Schweregrade existieren mehrere Klassifizierungen. Hunt und Hess⁹⁵ entwickelten 1968 eine klinische Klassifikation, die vor allem die Bewusstseinslage des Patienten zum Zeitpunkt der Blutung erfasst. Diese Einteilung hat sich im klinischen Alltag hinsichtlich der Prognoseeinschätzung als sehr zuverlässig erwiesen.

Weitere klinische Klassifikationen zur Schweregradeinteilung einer Subarachnoidalblutung sind die Einteilung der WFNS (World Federation of Neurological Societies)²⁴², die sich an der ursprünglich für die Traumatologie entwickelten Glasgow Coma Scale orientiert²³⁹⁻²⁴¹.

Die initiale Dauer der Bewusstlosigkeit korreliert in der Regel mit dem Ausmaß der Subarachnoidalblutung, wobei 15-20 % der Patienten in tiefer Bewusstlosigkeit verbleiben.

Hunt-& Hess-Skala		WFNS	
Grad	Neurologischer Befund	GCS	Motorische Defizite
0	Nicht-rupturiertes Aneurysma	15	Nein
I	Asymptomatische SAB, evtl. leichte Kopfschmerzen	15	Nein
II	Starke Kopfschmerzen und Meningismus; keine neurologischen Defizite außer Hirnnervenausfällen	14-13	Nein
III	Somnolenz; minimale neurologische Ausfälle	14-13	Ja
IV	Sopor; mässige bis schwere Hemiparese	12-7	Ja oder Nein
V	Tiefes Koma; Dezerebration	6-3	Ja oder Nein

Tabelle 1: Klinische Einteilung der Subarachnoidalblutung: Hunt-& Hess-Skala, WFNS Score

Neben der klinischen Einteilung einer Subarachnoidalblutung klassifiziert die Einteilung nach Fisher das Ausmaß von Subarachnoidalblutungen im CCT⁶⁰.

Grad	Einteilung nach Fisher
1	Kein Hinweis auf eine Blutung
2	Subarachnoidalblutung von weniger als 1 mm Breite
3	Subarachnoidalblutung von mehr als 1mm Breite, jedoch ohne Ventrikeleinbruch
4	Subarachnoidalblutung jeder Breite mit Ventrikeleinbruch oder Ausdehnung ins Gehirnparenchym

Tabelle 2: Einteilung der Subarachnoidalblutung im CCT nach Fisher

1.1.5 Diagnostik

Die cerebrale Computertomographie gilt als Untersuchung der ersten Wahl bei Verdacht auf Subarachnoidalblutung. Neben dem Nachweis der SAB und deren Ausmaß kann sie auch bereits eingetretene Komplikationen, wie z.B. Liquorzirkulationsstörungen (Hydrocephalus) und intrakranielle Hämatome darstellen. Darüber hinaus kann das Blutverteilungsmuster Hinweise auf die Lokalisation der Blutungsquelle geben. In Fällen verspäteter Diagnosestellung kann der bildgebende Nachweis, speziell bei leichter ausgeprägten Blutungen möglicherweise nicht mehr gelingen. Hier muss der Nachweis einer SAB über eine zusätzliche Lumbalpunktion erfolgen⁷⁵.

Ein wasserklarer und unauffälliger Liquor schließt eine SAB innerhalb der letzten 2-3 Wochen grundsätzlich aus⁵⁸.

Bei der Subarachnoidalblutung ist eine zusätzliche angiographische Abklärung der Frage der Blutungsquelle obligat. Für die reine Diagnostik genügt heute in aller Regel die CT-Angiographie, die invasivere Katheterangiographie bietet zusätzlich die Möglichkeit gegebenenfalls beim Nachweis eines Aneurysmas interventionell therapieren zu können (Coiling)⁴².

Eine weitere apparative Zusatzdiagnostik ist die transkraniale Doppler-Sonographie. Sie wird nach Aufnahme eines Patienten mit Subarachnoidalblutung in regelmäßigen Abständen durchgeführt und dient der Verlaufskontrolle hinsichtlich des Vasospasmus mit dem Ziel entsprechend therapeutisch reagieren zu können.

1.1.6 Therapie

Die Therapie hat zwei Komplikationen der Subarachnoidalblutung zum Ziel: erstens die Rezidivblutungsprophylaxe beim Nachweis von Gefäßmissbildungen, zweitens, die Behandlung des Vasospasmus.

Die Ausschaltung der Gefäßmissbildung als Rezidivblutungsprophylaxe richtet sich nach der zugrunde liegenden Malformation. Rupturierte Hirnarterienaneurysmen können entweder operativ in mikrochirurgischer Technik mittels Metallclip oder durch interventionelle Kathetertechnik ausgeschaltet werden, hierbei wird der Aneurysmasack in der Regel mit einem Mikroplatinkatheter austamponiert (Coiling). Die Versorgung der Blutungsquelle, bzw. der Verschluss des geplatzten Aneurysmas sollte in den ersten 72 Stunden nach SAB erfolgen, da in diesem Zeitraum die Gefahr einer potentiellen Nachblutung am größten ist. Studien haben gezeigt, dass die Mortalität im Falle einer Re-Ruptur des Aneurysmas deutlich erhöht ist und etwa bei 79% liegt. Außerdem kann die Prophylaxe gegen eventuelle Vasospasmen erst uneingeschränkt begonnen werden, wenn das Aneurysma ausgeschaltet wurde.

Zur Ausschaltung einer arterio-venösen Malformation steht neben der offen mikrochirurgischen Operation ebenfalls die interventionell radiologische Behandlung, aber auch eine Bestrahlung zur Verfügung, oft müssen diese Methoden auch kombiniert zur Anwendung kommen.

Nach erfolgreicher Ausschaltung der Blutungsquelle konzentriert sich die weitere Therapie auf die Prophylaxe und Behandlung möglicher Komplikationen der SAB an sich, allen voran die Behandlung des Vasospasmus. Als Folge der Subarachnoidalblutung und in Korrelation mit deren Ausmaß sind in den Folgetagen der Blutung vasospastische Reaktionen mit ischämischen

Komplikationen zu beobachten. Es gilt die Regel, dass ausgeprägte vasospastische Reaktionen bereits nach 3-5 Tagen auftreten. Jenseits des 10. Tages nach SAB nimmt diese Reaktion deutlich ab. Ausgelöst werden diese Gefäßspasmen nach bisherigen Untersuchungen durch Abbauprodukte des Blutes, initial aber auch durch Reaktionen auf die Gefäßruptur selbst. Letztlich für die Morbidität der SAB entscheidend ist das Ausmaß manifester Ischämien, die mit zum sekundären Hirnschaden führen. Therapeutische Ansätze zur Vermeidung dieser Komplikationen umfassen kreislaufunterstützende, zirkulatorische Maßnahmen, wie arterielle Hypertonie, Hypervolämie und Hämodilution, die sogenannte „Tripple H-Therapie“. Die eigentlich pharmakologischen Ansätze zur Vasospasmustherapie beschränken sich derzeit auf den Einsatz von Calciumantagonisten (Nimodipine)¹⁷⁹.

1.1.7 Pathophysiologie der Subarachnoidalblutung

Die Dauer der Subarachnoidalblutung und die Menge des ausgetretenen Blutes bestimmen den klinischen Verlauf und die Prognose als Ausdruck der passageren oder persistierenden Schädigung des Gehirns selbst^{30,213}.

Frühe pathophysiologische Phänomene nach einer Subarachnoidalblutung umfassen einen Anstieg des intrakraniellen Druckes (ICP)^{164,260}, einen infolge geminderten cerebralen Perfusionsdruck (CPP)^{61,165}, der wiederum die cerebrale Durchblutung (CBF) mindert und je nach Ausprägung und Dauer die Ischämie augmentiert. Durch die cerebrale Ischämie kommt es zur Zellschädigung und zur Störung der Blut-Hirn-Schranke¹⁴. Darüber hinaus führt die Blutung zur akuten Vasokonstriktion und zu einer gestörten cerebralen Autoregulation^{19,36}. Während physiologischerweise der CPP auch bei Schwankungen des systemischen Blutdruckes konstant gehalten wird, bricht im Rahmen einer Subarachnoidalblutung diese Autoregulation^{103,176,193} zusammen, was in Folge zu einem Abfall des cerebralen Perfusionsdruckes und zur Verstärkung der Ischämie führt¹⁶⁸.

1.1.7.1 ICP, CPP und CBF

Sowohl klinische, als auch experimentelle Studien beschreiben im Moment der Subarachnoidalblutung einen Anstieg des intrakraniellen Druckes (ICP), dessen Ausmaß mit der Menge an ausgetretenem Blut korreliert²⁶⁰. Als Ursachen für diesen Druckanstieg konnte in experimentellen Untersuchungen ein direkter Zusammenhang mit dem ausgetretenen Blutvolumen festgestellt werden²¹⁸ (Monroe-Kellie-Hypothese)^{127,128}, bei ausgiebigen Blutungen in den Subarachnoidalraum spielt außerdem die zunehmende Obstruktion im Liquorabflusssystem eine Rolle⁸³.

Die ICP-Erhöhung und die akute Vasokonstriktion, insbesondere auf mikrozirkulatorischer Ebene sind die beiden Hauptursachen für die Reduktion der cerebralen Durchblutung und des cerebralen Perfusionsdruckes nach Subarachnoidalblutung und führen zu einem generalisierten Hirnödem^{20,11,159,215}. Nach experimenteller SAB konstringieren die großen intracerebralen Gefäße sofort, beim Menschen kann diese akute Gefäßreaktion meist nicht beobachtet werden, trotzdem deuten Ergebnisse experimenteller Arbeiten darauf hin, dass es zu einer akuten mikrovaskulären Konstriktion nach SAB kommt, die angiographisch nicht nachgewiesen werden kann^{63,254}.

1.1.7.2 Der frühe Hirnschaden nach SAB

Dieser Begriff bezeichnet den akuten Hirnschaden nach einer Subarachnoidalblutung und ist erst kürzlich in den Fokus der Forschung gerückt. Unter dem Begriff „früher Hirnschaden“ werden ischämische, inflammatorische und apoptotische Reaktionen zusammengefasst, die alle ein gemeinsames Ergebnis haben, den neuronalen Zelltod^{11,36,38,65}.

Die akute globale Ischämie ist in der Lage inflammatorische Prozesse im Gehirn über das Blutungsareal hinaus zu triggern, obwohl in den ersten 48 Stunden nach SAB inflammatorische Prozesse in erster Linie im Hirnparenchym und in den Gefäßen im Bereich des ausgetretenen Blutes verstärkt auftreten. Für diese inflammatorische Reaktion sind eine Reihe von Mediatorsubstanzen verantwortlich zu denen auch das Kallikrein-Kinin System gehört¹⁶⁸.

Apoptose gehört ebenso zu den pathophysiologischen Prozessen, die durch eine Subarachnoidalblutung ausgelöst werden. Der erhöhte intrakranielle Druck und die ausgetretenen Blutbestandteile, die globale Ischämie und die Reperfusion sowie der akute Vasospasmus lösen apoptotische Vorgänge aus. Endotheliale Apoptose und die Auflösung der endothelialen Strukturen legen Kollagen der Basalmembran frei, was wiederum zu Thrombozytenaggregation und Thrombusformation führt. Die initiierte Thrombogenese führt zu embolischen Infarkten und zur Verschlechterung der Ischämie bedingten Klinik des Patienten^{36,37,87,188,221}.

Neueste Beobachtungen deuten darauf hin, dass apoptotische Vorgänge in Endothelzellen der kleinen Gefäße zeitgleich mit dem Zusammenbruch der Blut-Hirn-Schranke auftreten. Eine der ersten Komplikationen, die mit den pathophysiologischen Aspekten der Subarachnoidalblutung und den Apoptosekaskaden verbunden ist, ist die Störung der Blut-Hirn-Schranke. Es ist wahrscheinlich, dass sich die unmittelbar nach der Blutung auftretenden pathophysiologischen Störungen selbst als frühe Schädigung der Blut-Hirn-Schranke manifestieren^{72,125,177}, wobei späte Schädigungen der Blut-Hirn-Schranke durch die Apoptosevorgänge entstehen⁸⁵. Somit gibt es also eine biphasisch ablaufende Blut-Hirn-Schrankenstörung nach SAB.

1.1.7.3 Die Blut-Hirn-Schranke

Um die Rolle der Blut-Hirn-Schranke für die Pathophysiologie der SAB zu präzisieren wird an dieser Stelle kurz auf die physiologische Funktion der Blut-Hirn-Schranke eingegangen.

Das Gehirn ist von einer konstanten Nähr- und Sauerstoffversorgung abhängig, es setzt mit nur ca. 2% des Körpergewichts rund 20% der Gesamtenergie des Stoffwechsels um, daher bedarf es einer hohen und ungestörten cerebralen Durchblutung, um die Energieversorgung des Gehirns zu gewährleisten, gleichzeitig muss der Stoffaustausch zwischen Blutmilieu und Gehirnparenchym selektiv und kontrolliert erfolgen.

Die Blut-Hirn-Schranke dient der Aufrechterhaltung der Gewebshomöostase des Gehirns und verhindert den Eintritt von neurotoxischen Substanzen aus dem Blut ins Hirnparenchym¹. Sie ist die Voraussetzung für die Funktion und die Regulation des spezifischen Milieus im ZNS. Eine intakte neuronale Funktion ist nur durch die Aufrechterhaltung dieses spezifischen intracerebralen Milieus gewährleistet. Ständige Veränderungen in der Zusammensetzung des zirkulierenden Blutes hinsichtlich Hormonkonzentration, Ionen-, Aminosäure-, Proteinkonzentration und pH-Wert dürfen das intracerebrale Milieu nicht beeinträchtigen. Ebenso würde ein ungehindertes Übertreten von Neurotransmittern wie Serotonin und Glutamat aus dem Blut ins Gehirn die neuronale Signalübertragung empfindlich stören²⁹.

Die Blut-Hirn-Schranke wird maßgeblich durch das Endothel und durch interendotheliale tight junctions der Basalmembran von Gefäßen gebildet. Durch cerebrale Ischämie werden die tight junctions in ihrer Form und Funktion stark beeinträchtigt^{23,89,216,288}, was zu einer Störung der Blut-Hirn-Schranke und zur Entstehung eines Hirnödems führt.

Für den Durchtritt von Flüssigkeit aus dem Intravasalraum in das Gehirn sind aber auch Mediatorsubstanzen verantwortlich, die die Entstehung des vaskulären und parenchymalen Schadens fördern. Zu ihnen gehören Bradykinin¹⁸¹, Serotonin, Histamin²⁶⁴, Phospholipase A₂¹⁷, der Plättchen aktivierende Faktor (PAF), Arachidonsäure, Prostaglandine, Leukotriene²⁵, Interleukine^{1,262}, inflammatorische Proteine der Makrophagen, freie Radikale¹⁵⁷, Matrix Metalloproteinasen¹⁵⁶ und NO¹⁶⁹.

1.1.7.4 Das Hirnödem

Das Hirnödem ist definiert als eine Zunahme des Hirnwassergehaltes, die zu einer Expansion des Hirnvolumens führt¹³. Grundsätzlich wird eine zytotoxische von einer vasogenen Komponente des cerebralen Ödems unterschieden¹²¹.

Ein zytotoxisches Ödem beschreibt eine intrazelluläre Flüssigkeitsansammlung, die auf einer Störung des zellulären Stoffwechsels beruht, wie z.B. im Falle einer Ischämie. Es kommt zur Aktivierung der astrozytären Volumenregulation und zur Schwellung der Zellen. Der Interstitialraum ist dabei primär nicht verändert. Im Falle eines vasogenen Ödems steigt der extrazelluläre Flüssigkeitsanteil aufgrund einer kapillären Permeabilitätserhöhung der Blut-Hirn-Schranke und plasmaproteinhaltige Ödemflüssigkeit tritt in das Hirnparenchym über.

Eine der wichtigsten Ursachen für die hohe Mortalität und Morbidität nach SAB ist neben der Blutung und dem cerebralen Vasospasmus die Entwicklung eines Hirnödems und eine sich daraus entwickelnde cerebrale Ischämie²⁸⁷. Bei der Subarachnoidalblutung kommen beide Formen des Hirnödems vor, das zytotoxische und das vasogene Hirnödem¹⁶⁷. Nach experimenteller SAB konnte demonstriert werden, dass das zytotoxische Hirnödem bereits innerhalb der ersten zwei Minuten auftritt³². Diese Ergebnisse sprechen für eine globale Ischämie. Daraus resultiert ein ICP Anstieg, der wiederum zu einem Abfall des CBF und zu weiterer Ischämie führt. Dadurch wird die Blut-Hirn-Schranke zusätzlich geschädigt und apoptotische Kaskaden werden angestoßen, was die Schädigung der Blut-Hirn-Schranke weiter augmentiert^{28,50,62,79}. Das vasogene Hirnödem tritt als direkte Folge der Blut-Hirn-Schranken Störung auf und ist ein Hauptbestandteil des frühen Hirnschadens nach Subarachnoidalblutung^{44,56}.

1.2 Bradykinin als einer der Mediatoren des Hirnödems nach SAB

Das im Rahmen eines rupturierten Aneurysmas in den Subarachnoidalraum ausgetretene Blut ist für eine Kaskade von Reaktionen verantwortlich, die auch die Freisetzung verschiedener vasoaktiver und pro-inflammatorischer Substanzen aus dem Blut in den Subarachnoidalraum beinhalten. Neben neurogenen, inflammatorischen Prozessen, ausgetretenem Haemoglobin, Cyclooxygenasen und Stickstoffmonoxid Synthetasen spielen auch Serotonin, Histamin und Bradykinin eine entscheidende Rolle. Sie sind vor allem für die Blut-Hirn-Schrankenstörung verantwortlich²²⁵.

Bradykinin, als Peptid des Kallikrein-Kinin Systems, stellt einen Entzündungsmediator dar, dessen Wirkung neben der Induktion von Schmerz durch Reizung nozizeptiver Neurone, Vasodilatation von Arterien, Erhöhung der Gefäßpermeabilität, Venenkonstriktion auch in der Auslösung einer weiteren Aktivierungskaskade mit Freisetzung von Prostanoiden und NO besteht, der Summationseffekt manifestiert sich klinisch in einem Ödem¹⁴⁸.

Das Kallikrein-Kinin System ist einer der ersten Entzündungssignalwege, die nach einem Gewebeschaden aktiviert werden, eingeleitet wird dieser Signalweg durch die Aktivierung von Kallikrein⁴⁸. Die hochspezifischen Proteasen, die die Bildung von Kinin stimulieren, werden als

Kallikrein bezeichnet. Die Aktivierung von Kallikrein durch proteolytische Spaltung aus seiner inaktiven Vorstufe Präkallikrein kann durch den Hageman Faktor (Faktor XII der Blutgerinnung), Trypsin oder anderen Peptidasen erfolgen. Von Kallikrein gibt es eine Plasma- (p) und eine Gewebe- (tissue=t) Variante. Die Kinine werden vom Kallikrein aus ihren inaktiven Vorstufen, den Kininogenen abgespalten. Dadurch entsteht das Nonapeptid Bradykinin, das durch p-Kallikrein aus High Molecular Weight Kininogen (HMWK) abgespalten wird und das Dekapeptid Kallidin, welches durch t-Kallikrein aus Low Molecular Weight Kininogen (LMWK) entsteht. Bradykinin und Kallidin können durch die Kininasen I und II sowie andere Peptidasen abgebaut werden. Neben inaktiven Peptidasen entstehen des-Arg-Bradykinin und des-Arg-Kallidin¹⁹⁶.

Regoli und Barabé unterschieden zwei Kininrezeptoren: den B1 und den B2 Rezeptor^{197,198}.

Bradykinin und Kallidin sind die Hauptagonisten am Kinin B2 Rezeptor, des-Arg-Bradykinin und des-Arg-Kallidin dagegen wirken am Kinin B1 Rezeptor. Während der Kinin B2 Rezeptor konstitutiv exprimiert wird und die akuten Effekte des Kallikrein-Kinin-Systems induziert¹⁹⁶, geht man beim Kinin B1 Rezeptor davon aus, dass dieser erst nach Stimulation durch Zytokine wie Interleukin-1-β hergestellt wird^{147,196}. Der Kinin B1 Rezeptor soll die inflammatorische Antwort im Gewebe verstärken und ist vor allem bei chronischen Inflammationszuständen exprimiert, wo er die Bildung von Interleukin 1 und Tumornekrosefaktor α (TNF α) fördert.

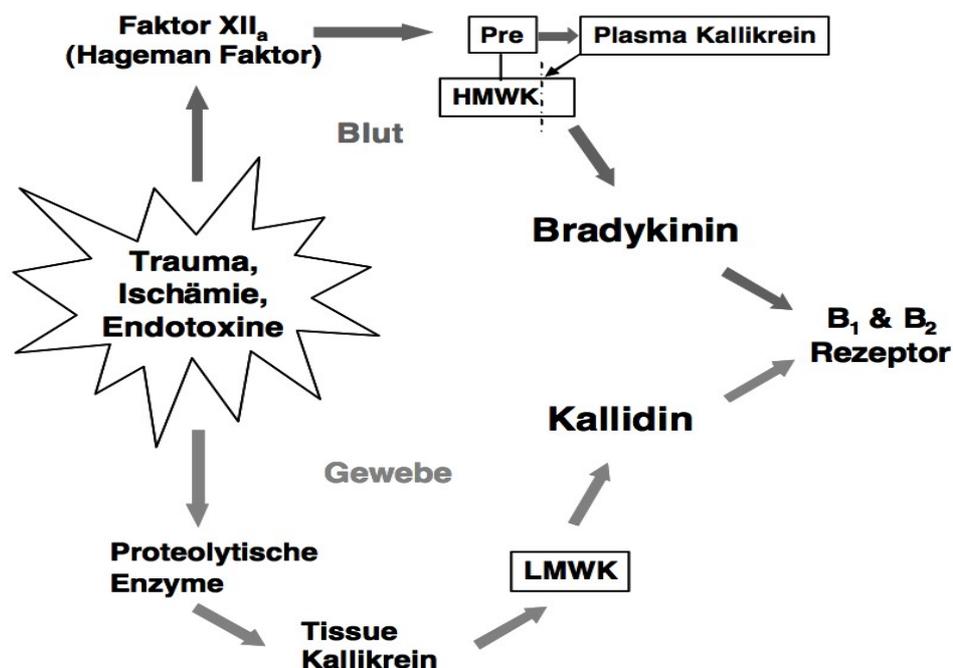


Abbildung 1: Aktivierung des Kallikrein-Kinin Systems

Wahl et al. haben fünf Kriterien formuliert, die eine Substanz aufweisen muss, um als Mediator eines Hirnödems zu gelten²¹⁴:

1. diese Substanz muss die Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke erhöhen
2. einen vasodilatatorischen Effekt haben
3. in der Lage sein, ein vasogenes Hirnödem zu erzeugen
4. unter pathologischen Bedingungen muss sich ihre Konzentration in Gewebe oder interstitieller Flüssigkeit erhöhen
5. eine Inhibierung ihrer Freisetzung oder Aktivität muss zu einer Verminderung des Hirnödems führen

Bradykinin erfüllt all diese Kriterien.

1.3 Matrix-Metalloproteinase-9

Die Matrix-Metalloproteinasen sind eine Gruppe von 26 Enzymen, die unter physiologischen Bedingungen an der Steuerung des normalen Wachstums und der Entwicklung beteiligt sind.

Diese extrazellulären zink- und calciumabhängigen Endopeptidasen bauen die extrazelluläre Matrix und andere extrazelluläre Proteine ab^{24,232}. Sie sind essentiell für den Umbau der extrazellulären Matrix, dem Aufbau von Gewebe und für Wundheilungsprozesse²⁷¹.

Matrix-Metalloproteinasen werden in erster Linie als inaktive Enzyme sezerniert. Um einen unerwünschten Abbau oder die Schädigung von extrazellulärer Matrix zu verhindern wird ihre Aktivität streng kontrolliert²³².

Auch MMP-9 ist ein induzierbares Enzym und wird in einer inaktiven Form sezerniert. Diese Proteinase ist hauptsächlich in inflammatorischen Zellen wie Makrophagen, Lymphozyten und neutrophilen Granulozyten, aber auch in Endothelzellen vorhanden. Sie kann jedoch auch an die extrazelluläre Matrix oder an Plasmamembranen gebunden vorkommen⁴⁷.

Die Kontrolle der MMP-9 Aktivität erfolgt durch drei Mechanismen: durch kontrollierte Transkription, durch Sekretion eines inaktiven Zymogens, welches proteolytisch aktiviert werden muss und durch Hemmung durch den endogenen Inhibitor TIMP-1⁷⁹.

MMP-9 steuert die Leukozytenmigration^{183,279}, baut Cadherine, Gelatin (denaturierte Kollagene), Kollagen IV, V und IX, sowie Elastin, Vitronectin, Melin-Basisches-Protein und andere Moleküle der Zellkommunikation ab²³². Die Basalmembran der Gefäße besteht aus einer Doppelschicht von extrazellulärer Matrix, Kollagen Typ IV und Laminin, verbunden durch Entactin^{201,282}.

Matrix-Metalloproteinase-9 ist im ZNS in der Regel nur in einem geringen Ausmaß konstitutiv in Mikroglia, Astrozyten und Hippocampusneuronen exprimiert, kann aber in diesen Zellen induziert werden^{12,49,79,280}.

Pathologisch erhöhte MMP-9 Konzentrationen in inflammatorischen Zellen und Endothelzellen können die Barrierefunktion der Blut-Hirn-Schranke herabsetzen, indem sie die vaskuläre Basalmembran schädigen und/oder die tight junctions der Endothelzellen abbauen. Dies führt zu einer erhöhten Gefäßpermeabilität und spielt bei einer ganzen Reihe von neurologischen Erkrankungen eine tragende Rolle²⁸¹, beispielsweise bei entzündlichen, demyelinisierenden Krankheiten^{6,73,137,145,204,205}, hemorrhagischer Hirnschädigung und cerebraler Ischämie^{66,158,206–208}. Darüber hinaus gibt es Hinweise, dass die Hemmung von Matrix-Metalloproteinasen der Zerstörung der Blut-Hirn-Schranke entgegenwirkt.

1.4 Hypothese und Fragestellung

Ziel der Arbeit war daher den Einfluss von Bradykinin durch die Kinin B1 und B2 Rezeptoren und von Matrix-Metalloproteinase-9 auf die Entstehung des sekundären Hirnschadens nach SAB zu untersuchen. Insbesondere ihre Bedeutung für die Entstehung eines Hirnödems sollte genauer beleuchtet werden. Da sowohl Bradykininrezeptoren als auch Matrix-Metalloproteinasen an der Hirnödementstehung beteiligt sind, haben wir die Hypothese aufgestellt, dass eine Hemmung dieser Signalkaskaden zu einer Verminderung des Hirnödems nach Subarachnoidalblutung führt.

Trotz zahlreicher Experimente, die eine große pathophysiologische Relevanz sowohl des Kallikrein-Kinin Systems als auch der Matrix-Metalloproteinase-9 bei cerebralen Pathologien nachgewiesen haben, gab es bisher speziell für die Subarachnoidalblutung keine detaillierten Untersuchungsergebnisse.

Die Fragestellung nach dem frühen Hirnschaden in der akuten Phase einer SAB wurde anhand eines experimentellen Tiermodells mit Bradykinin B1 und B2 Rezeptor Knockout-Mäusen und Matrix-Metalloproteinase-9 Knockout-Mäusen bearbeitet.

Durch die Ausschaltung des Gens ergibt sich die Möglichkeit die Rolle des entsprechenden Proteins, in diesem Falle der Kinin B1 und B1 Rezeptoren und von Matrix-Metalloproteinase-9 gezielt für den frühen Hirnschaden nach SAB zu untersuchen.

2 Material und Methoden

Die Untersuchungen wurden im Zeitraum von 2006 bis 2008 im Institut für Chirurgische Forschung der Ludwig-Maximilians-Universität München in der Arbeitsgruppe „Experimentelle Neurochirurgie“ von Prof. Dr. med. Nikolaus Plesnila, betreut durch Dr. med. Karsten Schöller, durchgeführt. Die Untersuchungen sind in verschiedene Abschnitte unterteilt worden. Im ersten Abschnitt wurde ein standardisiertes und reproduzierbares Modell zur Induktion einer Subarachnoidalblutung bei narkotisierten Mäusen etabliert. Anschließend wurde der Beitrag des Bradykinin B1 und B2 Rezeptors für die Entstehung des sekundären Hirnschadens nach Subarachnoidalblutung anhand von Bradykinin Rezeptor Knockout-Mäusen (im folgenden mit B1^{-/-} und B2^{-/-} abgekürzt) untersucht. In einem weiteren Abschnitt wurde die Rolle von Matrix-Metalloproteinase-9 (MMP-9) für die gleiche Fragestellung erforscht.

2.1 Versuchstiere

Zunächst fanden Vorversuche an C57/Bl6 Mäusen (Charles River, Sulzfed, Deutschland) zur Etablierung des experimentellen Modells statt. Die eigentlichen Versuche wurden sowohl an B1- und B2 Rezeptor Knockout-Mäusen (Jackson Laboratory, Bar Harbour, ME, USA) und C57/Bl6 Wildtyp-Mäusen (Charles River, Sulzfed, Deutschland), als auch an Matrix-Metalloproteinase-9 Knockout-Mäusen (Jackson Laboratory, Bar Harbour, ME, USA) und FVB/N Wildtyp-Mäusen (Charles River, Sulzfed, Deutschland) durchgeführt. Die B1- und B2 Rezeptor defizienten Mäuse (Jackson Laboratory, Bar Harbour, ME, USA) waren ursprünglich 1995 von Borkowski et al., Merck Research Laboratories, USA geschaffen worden^{27,28}. Um die genetische Variabilität zu vermindern, waren sie acht Generationen auf den Mäusestamm C57/Bl6 zurückgekreuzt worden.

MMP-9^{-/-}-Mäuse, ursprünglich von Vu et al.²⁶³ generiert, wurden gezüchtet und mehr als zehn Generationen auf den Mäusestamm FVB/N zurückgekreuzt.

Die für die Untersuchungen verwendeten Tiere wurden im Tierstall des Instituts für Chirurgische Forschung gezüchtet. Alle Tiere wurden in Macrolonkäfigen Typ 2 bei einer konstanten Raumtemperatur von 20 ± 1 °C und einer Luftfeuchtigkeit von 60% gehalten. Über eine Zeitschaltuhr wurde ein zwölf Stunden Tag-/Nachtrhythmus eingehalten. Futter (Trockenfutter Ssniff Spezialdiäten, Soest, Deutschland, mit 18000 I.E./kg Vitamin A, 1280 I.E./kg Vitamin D3, 120 mg/kg Vitamin E) und Trinkwasser standen ad libitum zur Verfügung. Alle Experimente wurden in Übereinstimmung mit den entsprechenden Richtlinien und Bestimmungen der Regierung von Oberbayern durchgeführt (Aktenzeichen 118/05).

2.2 Versuchsdurchführung

2.2.1 Allgemeine Versuchsbedingungen

Die Gruppenteilung der Versuchstiere erfolgte randomisiert. Der Operateur war während der gesamten Versuchsdurchführung, insbesondere auch bei der Durchführung der neurologischen Untersuchung der Tiere und der Auswertung verblindet.

2.2.2 Narkose

Die Narkoseeinleitung erfolgte durch gewichtsadaptierte intraperitoneale Injektion eines Gemisches aus 0,05 mg/kg KG Fentanyl (Fentanyl, Pfizer GmbH, Karlsruhe, Deutschland), 0,5 mg/kg KG Medetomidin (Domitor, Pfizer GmbH, Karlsruhe, Deutschland) und 5 mg/kg KG Midazolam (Midazolam-Hameln, Hameln Pharmaceuticals, Hameln, Deutschland). Zur Narkoseaufrechterhaltung wurde stündlich ein Viertel der Initialdosis des Gemisches injiziert. Für die Intubation wurden die Mäuse in Rückenlage auf einen Tisch im 45° Winkel unter dem Operationsmikroskop (OpMi-1, Carl Zeiss, Jena, Deutschland) gelagert und unter Sicht intubiert. Die korrekte Lage des Tubus wurde mikrokapnographisch verifiziert (MicroCapnoGraph CI240, Columbus Instruments, Columbus, USA). Eine Venenverweilkanüle der Größe 20 Gauge diente als Tubus. Sie wurde auf eine Länge von 22 mm gekürzt. Der Trokar der Venenverweilkanüle diente als Führungsstab. Um eine mögliche Verletzung der Trachea zu verhindern wurde die Spitze des Trokars auf eine Länge von 23 mm gekürzt und mit einer Feile abgestumpft. Die Plastikverbindung der Venenverweilkanüle wurde auf 4 mm gekürzt und mit einem Silikonstück abgedichtet, um eine dichte Verbindung zwischen dem Tubus und dem Y-Verbindungsstück zum Respirator zu erhalten. Mit Hilfe eines kleinen Bohrloches wurde die Meßsonde des Mikrokapnometers in das Plastikansatzstück eingepasst. Im Anschluss an die Intubation und die Verifizierung der korrekten Tubuslage erfolgte die mechanische Ventilation mit einem Kleintierrespirator (Minivent Typ 845, Hogo Sachs Elektronik, March Hugstetten)^{244,285}. Über den Respirator wurde das Tier mit einem Gasgemisch aus 35% Sauerstoff und 65% Luft beatmet.

2.2.3 Intraoperatives Monitoring

2.2.3.1 Beatmung

Durch die Meßsonde der Mikrokapnometrie wurde der endtidale Kohlendioxidpartialdruck (petCO₂) und die Atemfrequenz direkt am Tubusausgang mit einer Frequenz von 10 Hz gemessen. Das Gerät zog mit einer Pumpe kontinuierlich eine kleine Menge der ausgeatmeten Luft in eine

interne Messkammer, die mit einem Infrarotlicht, einem optischen Bandpassfilter und einem Detektor ausgestattet war. Dort wurde die Kohlendioxidkonzentration in der Probe gemessen. Das Atemvolumen, gewöhnlich zwischen 225-250 μ l und die Atemfrequenz zwischen 120-140 Atemzügen/min wurden gemäß dem petCO₂ angepasst. Sodass der petCO₂ zwischen 35-45 mmHg lag.

2.2.3.2 Temperaturkontrolle

Zur Aufrechterhaltung der Körpertemperatur und um ein Auskühlen der Maus während der Narkose zu verhindern wurde die Maus auf einer Heizplatte (FHC Temperature Control, Bowdoinham, ME, USA) positioniert und eine Temperatursonde rektal eingeführt. Die Temperatursonde war mit einem Temperaturhomöostasegerät verbunden, welches die Temperatur der Heizplatte regelte. Dadurch konnte die Körpertemperatur der Tiere bei 37°C konstant aufrechterhalten werden.

2.2.3.3 Intrakranielle Druckmessung

Präparationen erfolgten stets unter dem Operationsmikroskop (OpMi-1, Carl Zeiss, Jena, Deutschland). Für die Präparation und Anlage der ICP Sonde zur Messung des intrakraniellen Druckes wurde die Maus in Bauchlage positioniert und die Kopfhaut vom rechten Ohr bis kurz vor das rechte Auge inzidiert. Der M. temporalis wurde scharf vom Os temporale getrennt, stumpf nach lateral mobilisiert und mit einem Häkchen beiseite gehalten. Anschließend wurde ein ca. 1,5 mm großes Bohrloch in die Schädelkalotte gefräst (Bohrmaschine: Uni-Drive N, Paggen Werkzeugtechnik, Starnberg, Deutschland; Fräskopf: Aesculap GD870R, 0,5x5,1 mm, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland). Im Anschluss daran wurde die ICP-Sonde (Codman MicroSensor Basic, Codman, Norderstedt, Deutschland) epidural über dem rechten Kortex eingebracht, mit Knochenzement (Poly-F Plus Bondex, Dentsply De Trey, Konstanz, Deutschland) fixiert und mit dem ICP Monitor (ICP Express, Codman, Norderstedt, Detuschland) verbunden. Der Monitor zeigte mit einer Auflösung von 1 Hz den gemessenen intrakraniellen Druck in mmHg an.

2.2.3.4 Laser-Doppler Fluxmetrie (LDF)

Zur Messung der lokalen cerebralen Durchblutung mittels Laser-Doppler Fluxmetrie (LDF) wurde an der Maus in Bauchlage eine flexible Laser-Doppler Sonde (Perimed 4001 Master, Perimed, Järfälla, Sweden) angebracht. Die Kopfhaut wurde ausgehend vom linken Ohr in Richtung linkes Auge auf einer Strecke von ungefähr einem Zentimeter inzidiert. Der linke M. temporalis wurde scharf vom Os temporale getrennt und nach lateral mobilisiert. Danach wurde eine flexible Laser-Doppler Sonde kaudolateral des Bregma an der Schädelkalotte positioniert, was einem Punkt

zentral über dem Versorgungsgebiet der A. cerebri media entspricht. Mit einem Tropfen Cyanoacrylat Klebstoff (INSTA-CURE Glue, Plastruct, City of Industry, CA, USA) wurde die Sonde an der Kalotte befestigt und der Klebstoff mit einem Härter (INSTA-SET Accelerator, Plastruct, City of Industry, CA, USA) zum schnellen Aushärten gebracht. Noch während des Härtevorgangs wurde der Hautlappen die Sondenspitze gelegt um die Sondenspitze noch stabiler zu fixieren. Nach Umlagerung des Tieres auf den Rücken wurde die Sonde an die Laser-Doppler Fluxmetrie (Peri Flux 4001 Master, Perimed AB, Järfälla, Schweden) angeschlossen und die lokale cerebrale Durchblutung gemessen.

2.2.4 Induktion der Subarachnoidalblutung

Nach Anbringen der Sonden wurde das Tier auf dem Rücken gelagert und die Subarachnoidalblutung gemäß dem modifizierten Fadenmodell nach Bederson induziert¹⁹. Die Haut wurde ca. einen Millimeter rechts paramedian zwischen Manubrium sterni und Mandibula eröffnet, die Glandulae submandibulares und das Unterhautfettgewebe wurden nach lateral mobilisiert und mit einem Häkchen aus dem Operationsgebiet gehalten. Anschließend wurde die oberflächliche Halsfaszie gespalten, die rechtsseitige Arteria carotis communis sowie die Bifurcatio carotis mit den angrenzenden proximalen Anteilen der Aa. carotis externa und interna dargestellt. Nachfolgend wurde die A. thyroidea ligiert. Hierauf wurde die Arteria carotis externa ca. 0,3 cm distal der Bifurkation mit 5/0 Fäden (Silk braided, Pearstalls Ltd., Taunton Somerset, UK) ligiert. Mit einem weiteren 5/0 Faden, der anschließend der Fixierung des Perforationsfadens dienen sollte, wurde die A. carotis externa zwischen Ligatur und Bifurkation angeschlungen. Danach wurden die A. carotis communis ca. 0,5 mm proximal der Bifurkation und die A. carotis interna bifurkationsnah, noch vor dem Abgang der A. pterygopalatina jeweils durch einen Microclip (Zen Temporary Clip No. 10-b 13x0,4 mm, Ohwa Tsusho Co. Ltd., Tokyo, Japan) verschlossen. Im Anschluss daran wurde die A. carotis externa zwischen der Ligatur und der Umschlingung mit einer Mikroschere eröffnet, der Perforationsfaden in Form eines 3 cm langen monofilen 5/0 Prolene Fadens (Ethicon, Norderstedt, Deutschland) in das Gefäß eingeführt und mit der Umschlingung fixiert. Danach wurde die A. carotis externa durchtrennt. Nun wurden die temporären Microclips entfernt und der Perforationsfaden vorsichtig über die Bifurcatio carotis in die A. carotis interna vorgeschoben. Das Vorschieben des Fadens innerhalb der A. carotis interna erfolgte unter ICP und Laser-Doppler Kontrolle. Ein massiver ICP Anstieg binnen Sekunden mit gleichzeitigem Abfall der lokalen cerebralen Durchblutung signalisierte die Induktion einer Subarachnoidalblutung, woraufhin der Faden sofort bis in den Stumpf der A. carotis externa zurückgezogen und das Gefäß mittels Ligatur verschlossen wurde. Während des gesamten Eingriffes betrug die Ischämiezeit unter fünf Minuten.

2.2.5 Operationsende und Narkoseausleitung

Im Anschluss wurden die Wunden mit einer fortlaufenden Naht (Ethibond 5-0, Ehticon, Norderstedt, Deutschland) verschlossen. Nach dem vorsichtigen Entfernen der ICP Sonde wurde auch diese Wunde in der gleichen Weise verschlossen. Die Spitze der Laserdoppler Sonde wurde nahe am Schädel abgeschnitten.

Um die Narkose auszuleiten wurde jedes einzelne der Narkosemedikamente gewichtsadaptiert antagonisiert. Dafür wurden 1,2 mg/kg KG Naloxon (CuraMed Pharma GmbH, Karlsruhe, Deutschland), 0,5 mg/kg KG Flumazenil (Hoffmann-La Roche AG, Grenach-Wyhlen, Deutschland) und 2,5 mg/kg KG Atipamezol (Orion Pharma Pfizer, Karlsruhe, Deutschland) verwendet.

Nach Wiedererlangen der Schutzreflexe wurde das Tier extubiert und in seinen Tierkäfig zurückgebracht. Mitsamt Käfig kam die Maus zur Regeneration in einen Inkubator (Intensiv-Pflegeinkubator 7510, Drägerwerk AG, Lübeck, Deutschland), der auf eine Temperatur von 36°C aufgeheizt war und eine Luftfeuchtigkeit von 25% aufwies.

2.2.6 Datenerfassung

Die Daten wurden mit einem PC (Betriebssystem: Microsoft Windows 2000 Pro, PC System: F&P, München, Deutschland), ausgestattet mit einer Analog-/Digitalwandlerkarte von Adlink (AD 9112) und der Datenerfassungssoftware DasyLap 5.0 (measX, Mönchengladbach, Deutschland), erfasst. Es wurden Daten zum intrakraniellen Druck und zur lokalen cerebralen Durchblutung mit einer zeitlichen Auflösung von 10 Hz aufgezeichnet. Der ICP wurde 2,5 Minuten vor bis 15 Minuten nach Induktion der Subarachnoidalblutung erfasst. Zur Datenreduktion wurden jeweils zehn aufeinanderfolgende Daten zu einem Wert gemittelt und zur weiteren Verarbeitung im DasyLab-Datenformat gespeichert. Die Auswertung der Daten erfolgte mit dem Programm FlexPro 5.0 (Weisang, St. Ingbert, Deutschland). Der Zeitpunkt der Subarachnoidalblutung wurde anhand des ICP und CBF Kurvenverlaufs als der gleichzeitige ICP Anstieg und Abfall des Laserdoppler Signals definiert. Für die Berechnung der prozentualen Änderung der Laserdoppler Werte wurde der Basiswert aus dem Mittelwert der Daten sechs Minuten vor Beginn der Blutung bestimmt. Für den Zeitraum sechs Minuten vor dem Einsetzen der Blutung bis 15 Minuten nach Blutungsbeginn wurden im 3 Minuten Intervall die LDF Daten gemittelt und in Prozent des Basiswertes umgerechnet. Die berechneten Daten wurden in Sigma Plot 2000 (Systat Software, Erkrath, Deutschland) gespeichert und graphisch aufgearbeitet.

2.2.7 Protokolle der unterschiedlichen Versuchsgruppen

Die gesamte Arbeit lässt sich in drei Abschnitte unterteilen:

1. Aufbau des Modells in Vorversuchen:
 - a) Etablieren des Narkoseprotokolls und Einüben der Intubation
 - b) Anbringen der ICP- und LDF-Sonden
 - c) Einüben der Operationstechnik mit dem Ziel eines komplikationslosen Operationsverlaufs in einer möglichst kurzen Operationszeit und der Induktion identischer Blutungen
2. Untersuchung der Rolle der Bradykinin B1 und B2 Rezeptoren für die Entstehung des sekundären Hirnschadens nach Subarachnoidalblutung
3. Untersuchung der Rolle von Matrix-Metalloproteinase-9 für die Entstehung des sekundären Hirnschadens nach Subarachnoidalblutung

Nach Abschluss der Vorversuche wurden folgende Versuchsgruppen gebildet.

Gruppe	Tierstamm	Untersuchung
1	C57/Bl6	Überleben über 7-Tage, Gewicht, neurologische Funktionen
2	C57/Bl6, B2 ^{-/-}	Überleben über 7-Tage, Gewicht, neurologische Funktionen
3	C57/Bl6, B1 ^{-/-}	Überleben über 7-Tage, Gewicht, neurologische Funktionen
4	C57/Bl6	Gewicht, neurologische Funktionen, ICP- und Ödemmessung nach 24 h
5	C57/Bl6, B2 ^{-/-}	Gewicht, neurologische Funktionen, ICP- und Ödemmessung nach 24 h
6	C57/Bl6, B1 ^{-/-}	Gewicht, neurologische Funktionen, ICP- und Ödemmessung nach 24 h
7	FVB/Ncl	Überleben über 7-Tage, Gewicht, neurologische Funktionen
8	FVB/Ncl	Gewicht, neurologische Funktionen, ICP- und Ödemmessung nach 24 h
9	FVB/MMP 9 ^{-/-}	Überleben über 7-Tage, Gewicht, neurologische Funktionen
10	FVB/MMP 9 ^{-/-}	Gewicht, neurologische Funktionen, ICP- und Ödemmessung nach 24 h

Tabelle 3: Auflistung der einzelnen Versuchsgruppen mit Tierstamm und Versuchsaufbau

2.2.8 Postoperative Beobachtung über sieben Tage hinsichtlich Überleben, neurologischer Funktionen und Gewichtsverlauf

Bereits 48 und 24 Stunden präoperativ wurden die Tiere hinsichtlich ihrer neurologischen Funktionen bewertet und ihr Gewicht dokumentiert. Die neurologische Testung zu diesen Zeitpunkten erfolgte nicht nur um die Tiere an die Art der Testung zu gewöhnen sondern auch um Tiere auszuschließen, die schon vor der Operation nicht in der Lage waren die Tests richtig

auszuführen. Nach erfolgter Operation wurden die Gruppen 1, 2, 3, 7 und 9 sieben Tage lang beobachtet. Dabei wurden täglich ihr Überleben und ihre neurologischen Funktionen kontrolliert. Zusätzlich wurden die Tiere täglich zur selben Zeit mit einer digitalen Waage (Kern KB 800-2, Kern & Sohn GmbH, Balingen, Deutschland) gewogen. Der Gewichtsverlauf gilt als objektiver Parameter für das Allgemeinbefinden der Tiere. Um die geringen Gewichtsschwankungen anschaulich darstellen zu können wurde das Ausgangsgewicht der Mäuse vor der Operation als 100% angenommen und die Veränderungen dazu in Prozent angegeben.

2.2.8.1 Neuroscore

Um den postoperativen neurologischen Zustand der Mäuse zu objektivieren wurden sie jeden Tag zur selben Zeit mittels zweier neurologischer Tests (Neuroscores) beurteilt. So konnten Defizite hinsichtlich Bewusstsein, Verhalten, Atmung, Motorik und Sensorik ermittelt werden. Das Ausmaß und die Schwere der Funktionsstörungen wurden durch einen Punktwert widerspiegelt. Auch in den Versuchsgruppen, in denen nach 24 Stunden das Hirnödem bestimmt wurde, wurde vor der Entnahme des Gehirns ein Neuroscore erhoben.

Die Tiere wurden nach folgenden Kriterien beurteilt:

Neuroscore Teil 1

Im ersten Teil des Neuroscores¹¹³ können maximal 155 Punkte vergeben werden. Null Punkte steht dabei für das beste, 155 Punkte für das schlechteste erreichbare Ergebnis.

Kriterium		Zu vergebender Punktwert
Allgemeines Verhalten		
Bewusstsein	bestrebt die Umwelt spontan zu erkunden	0
	wach, aber passiv, nicht an der Umwelt interessiert	10
	komatös	20
Atmung		
	normal	0
	abnormal	20
Hirnnervenstatus		
Geruchssinn (schnuppert am Futter)	vorhanden	0
	nicht vorhanden	4
Visus	vorhanden	0
	nicht vorhanden	4
Corneal Reflex (mit Wattestäbchen ausgeführt)	vorhanden	0
	nicht vorhanden	4
Bewegung der Barthaare	vorhanden	0
	nicht vorhanden	4
Gehör (wendet sich Händeklatschen zu)	vorhanden	0
	Bewegung der Ohren	2
	nicht vorhanden	4
Motorik		
Schwanzbewegung	normal	0
	steif	5
	gelähmt	10

Bewegung der linken Vorderpfote	normal	0
	steif	5
	gelähmt	10
Bewegung der rechten Vorderpfote	normal	0
	steif	5
	gelähmt	10
Bewegung der linken Hinterpfote	normal	0
	steif	5
	gelähmt	10
Bewegung der rechten Hinterpfote	normal	0
	steif	5
	gelähmt	10
Sensorik		
Schmerzreaktion an den Pfoten	vorhanden	0
	nicht vorhanden	10
Schmerzreaktion am Schwanz	vorhanden	0
	nicht vorhanden	10
Koordination		
Balkengang (2,5 cm breiter Balken)	möglich	0
	nicht möglich	5
Balkengang (1,5 cm breiter Balken)	möglich	0
	nicht möglich	5
Die Vorderpfoten werden gestreckt, wenn die Maus am Schwanz hochgehoben wird	vorhanden	0
	nicht vorhanden	5
Aufrichtreflex (Maus dreht sich auf den Bauch, wenn sie auf den Rücken gelegt wird)	vorhanden	0
	nicht vorhanden	5

Halten an der Tischkante	vorhanden	0
	nicht vorhanden	5

Tabelle 4: Neuroscore zur Beurteilung von Bewusstsein, Verhalten, Atmung, Motorik und Sensorik

Neuroscore Teil 2 - Modifizierter Bederson-Score

Bei diesem Score konnten null bis fünf Punkte vergeben werden^{21,142}, wobei der Test so modifiziert wurde, dass analog zum ersten Teil des Neuroscores null Punkte das beste und fünf Punkte das schlechteste Ergebnis darstellen.

Kriterium	Punktwert
Neurologisch unauffällige Versuchstiere mit normalem Stellreflex (Tiere strecken beim Anheben am Schwanz beide Vorderpfoten in Richtung Boden)	0
Beim Anheben am Schwanz und Annäherung an den Boden: Flexion der zur Blutung kontralateralen Vorderpfote (eingeschränkter Stellreflex)	1
Eingeschränkter Widerstand und Standinstabilität bei lateralem Druck hinter der Schulter	2
Kreisbewegung (Circling) bei Zug am Schwanz	3
Spontanes Circling bei freier Bewegung auf dem Boden	4
Keine spontane motorische Aktivität (schweres Defizit)	5

Tabelle 5: Modifizierter Bederson-Score zur Beurteilung der motorischen Aktivität

NSS Score

Bei den MMP-9^{-/-} Mäusen und ihren Kontrollen wurde die neurologische Beurteilung zusätzlich um einen Score erweitert, sodass die neurologische Untersuchung dreiteilig war und insgesamt statt maximal 160 180 Punkte vergeben werden konnten.

Die Mäuse wurden in der Mitte eines Ringes platziert und beobachtet. Schaffte das Tier es, binnen zwei Minuten aus dem Kreis zu entkommen, erhielt es null Punkte, ging es zum Rand des Kreises und stellte sich auf die Begrenzung erhielt es einen Punkt. Entkam es dem Kreis nicht, wurden zwei Punkte vergeben. Zudem wurde die Suchreaktion der Mäuse in dem Kreis beurteilt, wobei die Mäuse für eine aktive Suchreaktion null Punkte und für eine weniger aktive Suche einen Punkt bekamen. Blieben sie einfach in der Mitte des Kreises sitzen und bewegten sich nicht wurden zwei Punkte vergeben. Wenn das der Fall war wurde über der Maus geklatscht, löste auch das keine Reaktion aus, erhielt die Maus weitere zwei Punkte, reagierte das Tier wurden keine weiteren Punkte zum Score addiert. Anschließend wurde beurteilt, wie die Tiere liefen, konnten sie geradeaus laufen erhielten sie keine weiteren Punkte. Ein Punkt wurde vergeben, wenn sie im Kreis liefen, bzw. zirkelten, bewegten sie sich gar nicht wurden zwei Punkte vergeben. Zusätzlich wurde

getestet, ob und wie die Mäuse auf Balken von drei, zwei und einem Zentimeter Breite liefen. Hier wurde ein flüssiges Laufen über den Balken mit null Punkten bewertet, lief die Maus langsam oder griff sie nicht richtig mit der Hinterpfote bekam sie 0,5 Punkte, ist sie nach wenigen Schritten vom Balken gefallen erhielt sie zwei Punkte. Hinzu kamen Greifversuche um die Kraft in den Vorderpfoten beurteilen zu können. Die Tiere wurden an einem runden und einem kantigen Stab hochgezogen. Konnten sie sich mit den Vorderpfoten daran festhalten kamen keine weiteren Punkte hinzu. Waren die Mäuse nicht in der Lage sich an dem Stab festzuhalten erhöhte sich ihr Neuroscore um weitere zwei Punkte. Zusätzlich wurde darauf geachtet, ob eine Hemiparese vorlag, die sofern sie vorhanden war den Score um weitere zwei Punkte erhöhte.

2.2.9 ICP Messung 24 Stunden postoperativ

Um eine intrakranielle Druckmessung 24 Stunden nach Induktion der Subarachnoidalblutung vorzunehmen wurden die Tiere erneut auf dieselbe Art und Weise, wie bereits unter 2.2.2 beschrieben, mit der Kombination aus Midazolam, Fentanyl und Medetomidin narkotisiert und intubiert. Die Mäuse wurden auf den Bauch gelagert und der Tubus wurde mit dem Kleintierrespirator und dem Mikrokapnometer verbunden, siehe auch 2.2.3.1. Im Anschluss daran wurde die rechtsseitige Wunde am Kopf wieder eröffnet, seröses Wundsekret vorsichtig entfernt und der M. temporalis nach lateral geklappt um die ICP Sonde langsam wieder durch das bereits angelegte Bohrloch nach epidural vorzuschieben. Danach erfolgte eine 15 minütige Aufzeichnung des ICP.

2.2.10 Gravimetrische Bestimmung des Hirnwassergehalts

Zur Quantifizierung des Hirnödems wurde 24 Stunden nach Induktion der Subarachnoidalblutung der Hirnwassergehalt der ipsi- und kontralateralen Hemisphäre gravimetrisch bestimmt. Dazu wurden die narkotisierten Tiere nach abgeschlossener ICP Messung durch cervikale Dislokation getötet und dekapitiert. Die Kopfhaut wurde durch einen medianen Schnitt inzidiert und samt Temporalmuskel nach kaudolateral verdrängt um einen besseren Zugang zur Kalotte zu erhalten. Zunächst wurde das Schädeldach vorsichtig interorbital und okzipital inzidiert, danach okzipital vom Ansatz der Nackenmuskulatur bis zum interorbitalen Schnitt eröffnet. Die Knochenlamellen wurden mit Hilfe eines Spatel nach lateral weggeklappt. Anschließend wurde das Rückenmark durchtrennt und das Gehirn nach Absetzen des Bulbus olfactorius und der beiden Nn. optici mit einem breiten Spatel vorsichtig entnommen.

Die entnommenen Gehirne wurden in eine gekühlte Schnittform (Matrix) gegeben, danach wurden mit einer ebenfalls gekühlten Rasierklinge (Apollo, Solingen, Deutschland) der Okzipitalpol und

der Frontalpol samt Rhinencephalon abgetrennt sowie die beiden Hemisphären in der Medianebene voneinander getrennt.

Unmittelbar nach Entnahme und Trennung wurde je eine Hemisphäre in ein verschließbares Wiegegläschen gelegt. Die Wiegegläschen waren vor Gebrauch mindestens 12 Stunden bei 110°C im Trockenschrank (Memmert G-201363/-201927, Schweiz) getrocknet worden und mindestens eine Stunde vor Hirnentnahme, zur Abkühlung auf Raumtemperatur, in einem Exsiccator aufbewahrt worden. Kurz vor der Hirnentnahme wurden die leeren, verschlossenen Gläschen auf einer elektronischen Waage gewogen (AG 245, Mettler Toledo, Giessen, Deutschland). Um das Feuchtgewicht der einzelnen Hemisphären zu erhalten wurden die Wiegegläschen schließlich jeweils mit einer Hemisphäre befüllt und erneut gewogen. Das Feuchtgewicht (FG) der Hirnhemisphären ergab sich aus der Differenz des Gewichts der gefüllten und der leeren Gläschen.

Nun wurden die Hemisphären für 24 Stunden bei 110°C in einen Wärmeschrank getrocknet, bevor ihr Trockengewicht bestimmt wurde, indem die Gläschen mit den getrockneten Hemisphären erneut gewogen wurden. Aus den gravimetrisch ermittelten Werten von Feucht- und Trockengewicht konnte anschließend anhand folgender Formel die Zunahme an Hirnwasser berechnet werden:

Wassergehalt einer Hemisphäre [%]= [(Gewicht des feuchten Gehirns - Gewicht des trockenen Gehirns) /Gewicht des feuchten Gehirns] *100

2.2.11 Histomorphologische Bestimmung des neuronalen Zellschadens

2.2.11.1 Histologie

Zur quantitativen Erfassung des morphologischen Schadens wurden die Gehirne der Versuchstiere am siebten postoperativen Tag perfusionsfixiert, entnommen und für die morphometrische Auswertung histologisch aufbereitet. Hierfür wurden die Mäuse in tiefer Chloralhydratnarkose thorakotomiert, mit einem Butterfly (Butterfly®- 25 short, Abbott GmbH, Wiesbaden, Deutschland) die linke Herzkammer punktiert und das Butterfly mit einer Klemme fixiert. Anschließend wurde mit einer Schere das rechte Herzohr eröffnet. Über die Punktionsnadel im linken Ventrikel erfolgte zunächst für ca. eine Minute eine Spülung des gesamten Gefäßsystems mit physiologischer Kochsalzlösung (Braun-Melsungen AG, Melsungen, Deutschland). Anschließend wurde das Tier ca. zehn Minuten mit 4%-iger Phosphat-gepufferter (pH= 7,4) Paraformaldehydlösung unter dem Druck von 100 cm Wassersäule (Apotheke Klinikum Innenstadt, LMU, München, Deutschland) perfundiert.

Die Tiere wurden, wie bereits unter 2.2.10 beschrieben, dekapitiert, die Kopfhaut durch eine

mediane Inzision eröffnet und samt M. temporalis nach lateral verdrängt, um einen besseren Zugang zur Schädelkalotte zu gewährleisten. Der Schädel wurde durch einen Schnitt in das interorbitale Schädeldach und durch einen weiteren Schnitt vom Ansatz der Nackenmuskulatur bis hin zum interorbitalen Schnitt eröffnet und beide Hälften der Kalotte nach lateral weggeklappt. Daraufhin wurde mit einem Spatel das Rückenmark durchtrennt und das Gehirn vorsichtig entnommen.

Das entnommene Gehirn wurde in ein, mit 4% iger gepufferter Paraformaldehydlösung gefülltes Gefäß gegeben und mindestens 24 Stunden bei 4°C im Kühlschrank gelagert.

Später wurde das Gehirn in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70%-90%-96% Ethanol) dehydriert und in Paraffin eingebettet. Die Einbettung der Gehirne in Paraffin erfolgte mit einem Einbettautomat (Shardon, Deutschland) nach Standardprotokoll. Mit einem Mikrotom (Mikrotom 2030, Reichert-Jung, Heidelberg, Deutschland) wurden 5 µm dicke koronare Serienschritte angefertigt, auf Objektträger aufgebracht und nach Nissl gefärbt. Dazu wurden die Schnitte zur Entparaffinisierung zwei mal zehn Minuten lang in Rotihistol (Roth, Karlsruhe) gelegt, anschließend mittels einer absteigenden Alkoholreihe entwässert (zwei Minuten 100% Ethanol, zwei Minuten 96% Ethanol, zwei Minuten 70% Ethanol) danach für zehn Minuten in Cresylviolett nach Nissl gelegt. Danach erfolgte eine kurze Spülung der Schnitte mit destilliertem Wasser und die Entwässerung durch eine aufsteigende Alkoholreihe (Eintauchen in 70% Ethanol, Eintauchen in 96% Ethanol, Eintauchen in 100% Ethanol, zwei Minuten Einlegen in reines Isopropanol), gefolgt von zwei mal vier Minuten in Rotihistol. Abschließend wurden die Schnitten mit Eukitt eingedeckt.

2.2.11.2 Morphometrie

Der neuronale Zelltod wurde in den Hippocampusregionen CA 1-3 untersucht. Diese Regionen wurden mit Hilfe eines stereotaktischen Hirnatlas unter einem Mikroskop (Leica Mikrosysteme, Bensheim, Deutschland) mit 16-facher Vergrößerung aufgesucht. Das Mikroskop ist über einen Adapter mit einer Kamera (Fuji Digital Camera HC 300Z) verbunden. Die Kamera wiederum ist über einen USB Anschluss mit einem PC verbunden, auf den die Bilddaten mittels Fuji Photograb 300Z Software übertragen wurden. Die übertragenen Aufnahmen wurden mit einer Bildbearbeitungssoftware (Optimate 6.51, BioScan Inc.Edmonds, USA) ausgewertet. Hierfür wurden alle Bilder in eine einheitliche Position gedreht und ein zuvor definierter Rahmen über das Bild gelegt. Es wurden die, im Rahmen vorhandenen, vitalen Neurone gezählt.

Diese Auszählung erfolgte verblindet. Als intakte, vitale Neurone wurden solche gewertet, die folgende Merkmale besaßen⁷⁴:

- scharf abgegrenzter Nukleus
- klar erkennbarer Nukleolus in der Mitte des Nukleus
- klar vom umgebenden Neuropil abgrenzbares neuronales Zytoplasma
- weniger als ein Drittel des Neurons umgeben von konfluierenden Vakuolen²³⁵

2.3 Statistische Datenauswertung

Statistische Analysen wurden mit der statistischen Auswertesoftware SigmaStat 3.1 (Systat Software, Erkrath, Deutschland) durchgeführt und die Graphen mit der Software SigmaPlot 9.0 (Systat Software, Erkrath, Deutschland) erstellt. Sofern nicht anders gekennzeichnet, sind die Daten als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes (SEM) angegeben.

Zur Beurteilung der Daten wurden Varianzanalysen für unverbundene Stichproben durchgeführt. Die Nullhypothese, d.h. kein statistisch nachweisbarer Unterschied der untersuchten Daten, wurde mit einer Fehlerwahrscheinlichkeit von 5% abgelehnt. Unterschiede wurden als signifikant angenommen, sobald sich $p < 0,05$ darstellte⁶⁸.

Was die Bradykinin Versuche betrifft, wurden unverbundene Daten mit dem Kruskal-Wallis-Test⁴⁰ und verbundene Daten mit dem Friedman-Test ausgewertet. Bei den MMP-9^{-/-} Mäusen und ihren Kontrollen wurden analog der Mann-Whitney-Rank-Sum-Test und der Signed-Rank-Test verwendet, wobei Laserdoppler- und ICP-Daten im Intergruppenvergleich als unverbundene Daten betrachtet wurden. Vergleiche innerhalb einer Gruppe wurden als verbundene Daten betrachtet^{248,249}.

Die Ergebnisse der neurologischen Untersuchungen wurden anhand der one-way Varianzanalyse im Intergruppenvergleich an allen Beobachtungstagen auf signifikante Unterschiede hin getestet.

Soweit nachfolgende Paarvergleiche notwendig waren, wurden diese mit dem Student-Newman-Keuls-Test oder Dunnett Test durchgeführt. Die Sterblichkeit der Gruppen wurde mit dem Chi-Quadrat-Test verglichen.

3 Ergebnisse

3.1 Einfluss von Bradykinin auf die Entstehung des frühen Hirnschadens nach SAB

Für die Untersuchung der Fragestellung, ob und inwieweit Bradykinin Einfluss auf die Entstehung des sekundären Hirnschadens nach SAB nimmt, wurden B1^{-/-}, B2^{-/-} und als Kontrolltiere C57/B16-Mäuse nach der Operation verblindet verschiedenen Versuchszweigen zugeführt.

3.2 Beobachtungen über sieben Tage nach Subarachnoidalblutung

Wie bereits beschrieben, wurde ein Teil der Mäuse nach der Subarachnoidalblutung über sieben Tage beobachtet, wobei täglich Überleben, Gewicht und neurologische Defizite dokumentiert wurden. Am siebten postoperativen Tag wurden die Gehirne der Mäuse entnommen und für die histologische Auswertung präpariert.

3.2.1 Pathophysiologische Veränderungen zum Zeitpunkt der experimentellen SAB

3.2.1.1 Anstieg des intrakraniellen Druckes

Sowohl bei den Bradykinin Rezeptor Knockout-Mäusen, als auch bei den entsprechenden C57/B16 Kontrollen war der intrakranielle Druck vor der Gefäßperforation an der Gabelung zwischen Arteria cerebri media und Arteria cerebri anterior, wie unter 2.2.4 beschrieben, normwertig. Der ICP betrug in der Kontrollgruppe $5,7 \pm 0,1$ mmHg (MW \pm SEM), in der B1^{-/-} Gruppe $7,5 \pm 0,2$ mmHg und in der Gruppe der B2^{-/-} Mäuse $5,8 \pm 0,1$ mmHg.

Zum Zeitpunkt der Gefäßperforation stieg der intrakranielle Druck sofort an. Dieser Druckanstieg ist ein Charakteristikum für die Induktion einer Subarachnoidalblutung.

ICP Verlauf

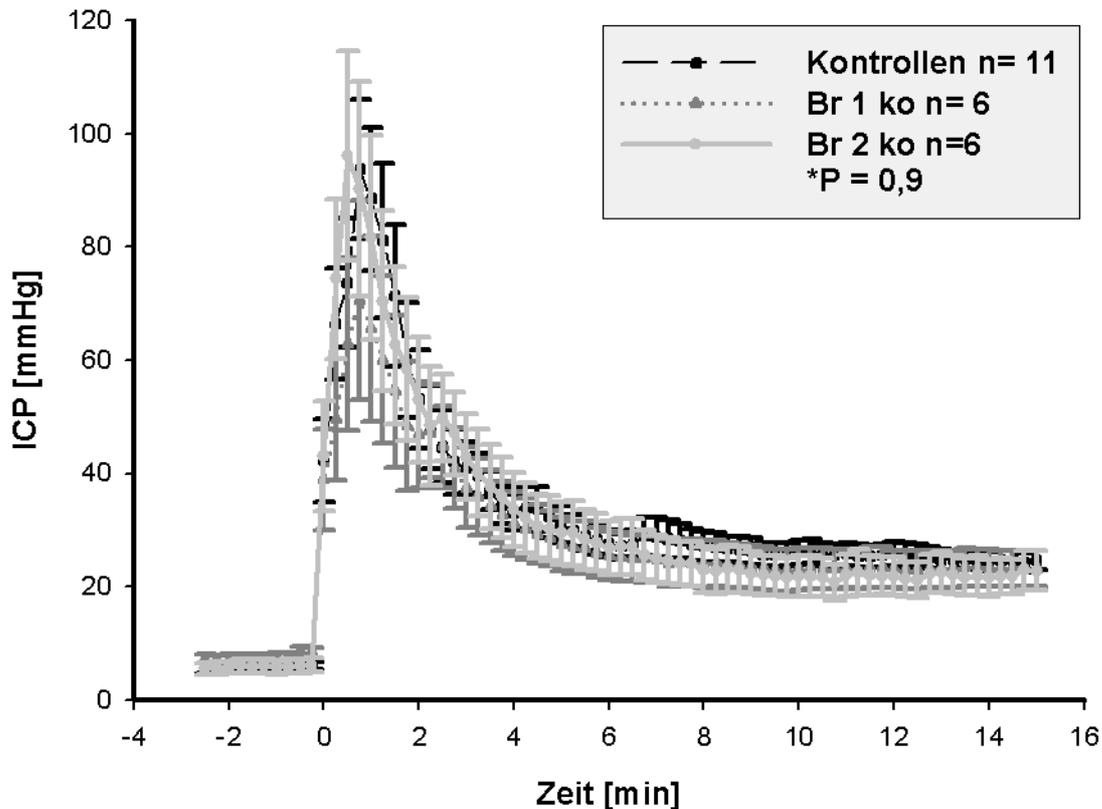


Abbildung 2: ICP- Verlauf der $B1^{-/-}$, $B2^{-/-}$ und C57/Bl6-Mäuse, die über 7 Tage beobachtet wurden. Der Zeitpunkt „0“ markiert die Induktion der SAB

Der rasante Anstieg des ICP gipfelte in einem Maximum von 93,7 mmHg bei den C57/Bl6 Mäusen, 70,5 mmHg bei den $B1^{-/-}$ und 96,1 mmHg bei den $B2^{-/-}$. Dieser Peak entspricht dem erreichten mittleren arteriellen Druck (MAP). Durch das Erreichen des mittleren arteriellen Druckes wird das Gefäßleck tamponiert und verschlossen wodurch ein weiterer Austritt von Blut verhindert wird. Die Gefäßtamponade und die Umverteilung des Blutes im cerebrospinalen Raum spiegelt sich in einem Abfall des intrakraniellen Druckes wider. Der ICP wurde wie unter 2.2.6 beschrieben bis 15 Minuten nach Einsetzen der Subarachnoidalblutung gemessen, zu diesem Zeitpunkt war der intrakranielle Druck in allen Gruppen wieder deutlich abgefallen und betrug durchschnittlich $23,5 \pm 0,5$ mmHg. Zu keinem Zeitpunkt bestand ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen.

3.2.1.2 Abfall der cerebralen Durchblutung

Zeitgleich mit dem ICP Anstieg bis in die Höhen des mittleren arteriellen Blutdruckes konnte in allen Gruppen ein Abfall der cerebralen Durchblutung auf durchschnittlich 23,7% des

Ausgangswertes beobachtet werden. Nach wenigen Minuten erholte sich die cerebrale Durchblutung wieder, wobei die Perfusion auf 74,7% des Ausgangswertes anstieg, den Ausgangswert jedoch nicht mehr erreichte. Es ließen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen erkennen.

3.2.2 Postoperatives Outcome über sieben Tage

3.2.2.1 Überleben

Die postoperative Mortalität wurde über sieben Tage beobachtet, dabei wurde untersucht, ob Bradykinin Rezeptor Knockout-Mäuse aufgrund der Deletion der Kinin B1 und B2 Rezeptoren im Vergleich zu den Kontrollen ein besseres Outcome aufweisen.

Die postoperative Mortalität in der Kontrollgruppe lag bei 73%. Von den acht Mäusen, die postoperativ innerhalb der sieben Tage verstarben, starb eine innerhalb der ersten 24 Stunden, eine weitere innerhalb der ersten 48 Stunden, am dritten Tag verstarb eine Maus und zwei weitere verstarben am vierten Tag nach der Operation. Am fünften, sechsten und siebten Tag verstarb jeweils eine C57/Bl6 Maus aus der Kontrollgruppe.

Während die Mortalität in der Kontrollgruppe bei 73% lag, verstarben alle elf B1^{-/-} Mäuse innerhalb des Beobachtungszeitraumes nach SAB, woraus sich eine Mortalität von 100% ergibt. Von den Bradykinin-1 Rezeptor defizienten Mäusen verstarb eine innerhalb der ersten 24 Stunden, drei weitere innerhalb der ersten 48 Stunden nach Subarachnoidalblutung und eine am vierten Tag post SAB. Am fünften Tag nach Induktion der Blutung starben vier der elf Mäuse und jeweils eine weitere Maus am sechsten und am siebten Tag. Daraus ergibt sich jeweils eine Mortalität von 36% in den ersten 48 Stunden und am fünften Tag nach SAB.

Die Bradykinin-2 Rezeptor Knockout-Mäuse wiesen eine postoperative Mortalität von 50% bis zum siebten Tag nach SAB auf. Auffallend in dieser Gruppe ist, dass kein Tier innerhalb der ersten 24 Stunden nach SAB verstarb. Es starb eine Maus am zweiten postoperativen Tag und zwei weitere am fünften Tag nach der Subarachnoidalblutung. Bei den B2^{-/-} verstarben die meisten Tiere am fünften Tag nach SAB.

Letalität

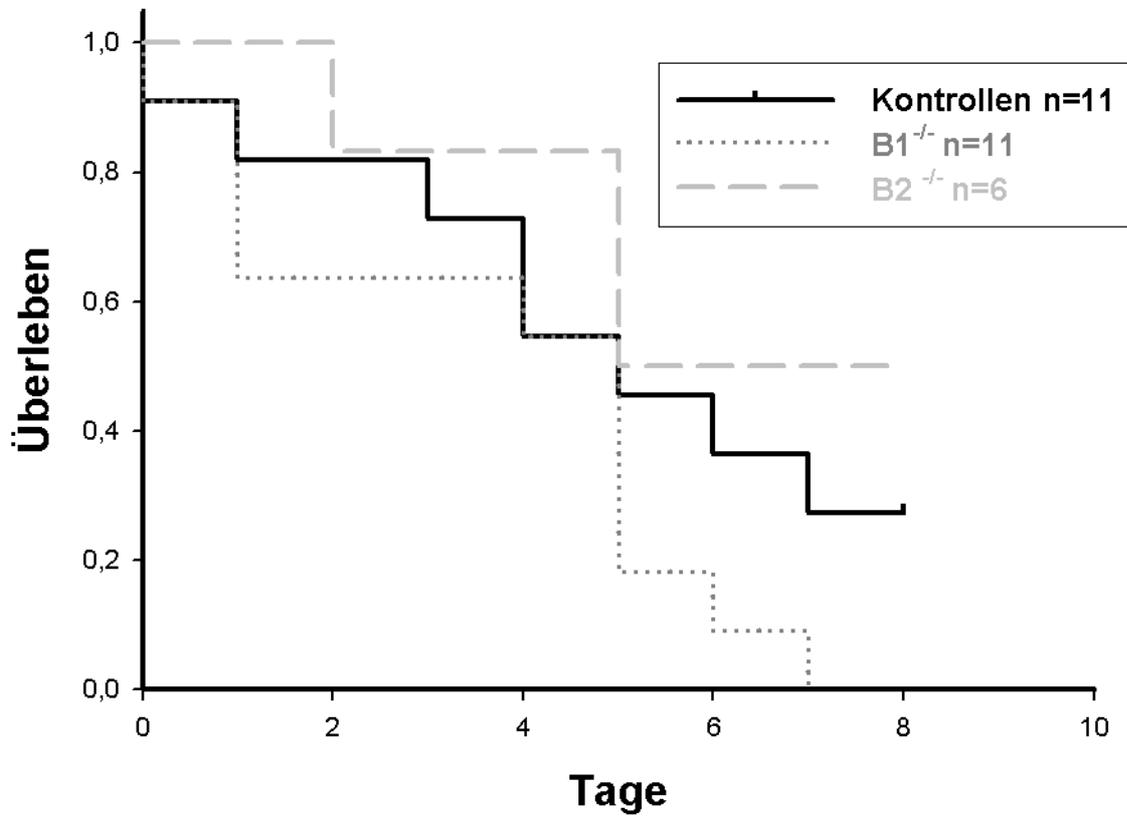


Abbildung 3: Überlebenszeit der B1^{-/-}, B2^{-/-} und C57/B16-Mäuse.

In dieser Abbildung ist die Anzahl der noch lebenden Tiere vom Tag der Induktion bis zu einer Woche nach SAB dargestellt. Da sowohl in der Kontrollgruppe, als auch in der Gruppe der B1^{-/-} Mäuse jeweils ein Tier bereits innerhalb der ersten 24 Stunden nach der Subarachnoidalblutung verstarb fängt die Kurve für diese Gruppen nicht bei 1,0 an.

3.2.2.2 Neurologische Funktionen

Wie bereits unter 2.2.8.1 beschrieben, wurden die Tiere postoperativ über sieben Tage täglich mittels zweier neurologischer Tests beurteilt, um einen objektiven neurologischen Status und seinen Verlauf zu dokumentieren. Die erste neurologische Beurteilung erfolgte 24 Stunden nach Subarachnoidalblutung. Im allgemeinen Neuroscore konnten maximal 155 Punkte und im Bederson-Score maximal 5 Punkte erreicht werden, wobei null Punkte das beste zu erreichende Ergebnis darstellt und einer normalen neurologischen Funktion entspricht, 155 bzw. 5 Punkte entsprechen dem schlechtesten zu erreichenden Ergebnis. Es folgen zunächst die Auswertung der Neuroscore-Daten aller Tiere und im Anschluss die Daten der Tiere, die den Beobachtungszeitraum überlebt haben und abschließend die der Tiere, die verstarben.

Neuroscore aller Mäuse

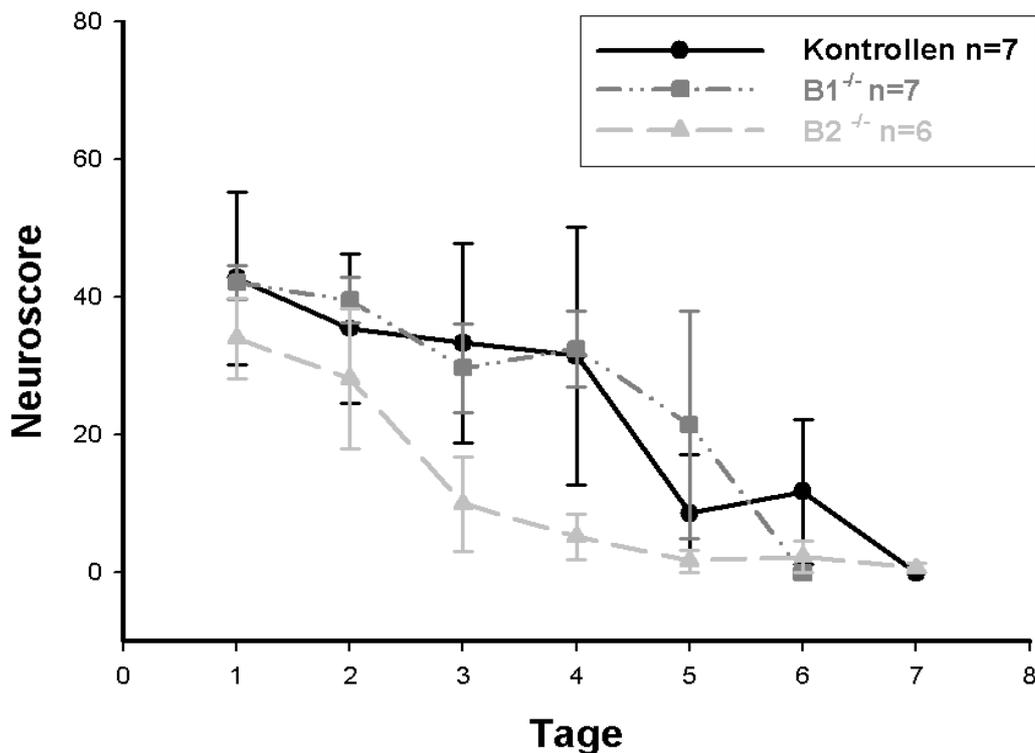


Abbildung 4: Neuroscore aller B1^{-/-}, B2^{-/-}- und C57/Bl6-Mäuse über 7 Tage

Betrachtet man den Neuroscore aller Tiere über sieben Tage post Subarachnoidalblutung, fällt auf, dass das Maximum der neurologischen Beeinträchtigung in allen Gruppen auf den ersten Tag fiel. Zu diesem Zeitpunkt hatten die C56/Bl6 Wildtyp-Mäuse $42,8 \pm 12,6$ (MW \pm SEM) Punkte im Neuroscore, die B1^{-/-} Mäuse hatten $42,1 \pm 2,5$ Punkte und die B2^{-/-} Mäuse hatten $34,0 \pm 5,8$ Punkte im Neuroscore. Diese funktionellen Defizite verbesserten sich im Lauf der sieben Tage. Die B2^{-/-} Mäuse zeigten insgesamt die geringsten neurologischen Defizite und erholten sich am schnellsten, sie hatten bereits am dritten Tag nach SAB deutlich geringere Defizite bei einem Punktescore von $10,0 \pm 6,9$ Punkten. Die C57/Bl6 hingegen erholten sich erst am fünften Tag merklich und hatten dabei $31,5$ Punkte am vierten postoperativen Tag und $8,6 \pm 8,6$ Punkte am fünften Tag nach SAB. Die B1^{-/-} Mäuse zeigten nur langsam eine Verbesserung der funktionellen Defizite. Obwohl sie in den ersten vier Tagen nach SAB nur geringfügig schlechtere Neuroscore Werte hatten als die C57/Bl6 ($32,5$ versus $31,5$ Punkte), war am fünften postoperativen Tag ein deutlicher Unterschied von $8,6$ Punkten bei den C57/Bl6 versus $21,5$ Punkten den B1^{-/-} Mäusen vorhanden. Im statistischen Vergleich bezüglich des Neuroscore Wertes an jedem Tag nach SAB zeigten sich keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen.

Neuroscore der Mäuse, die sieben Tage überlebten

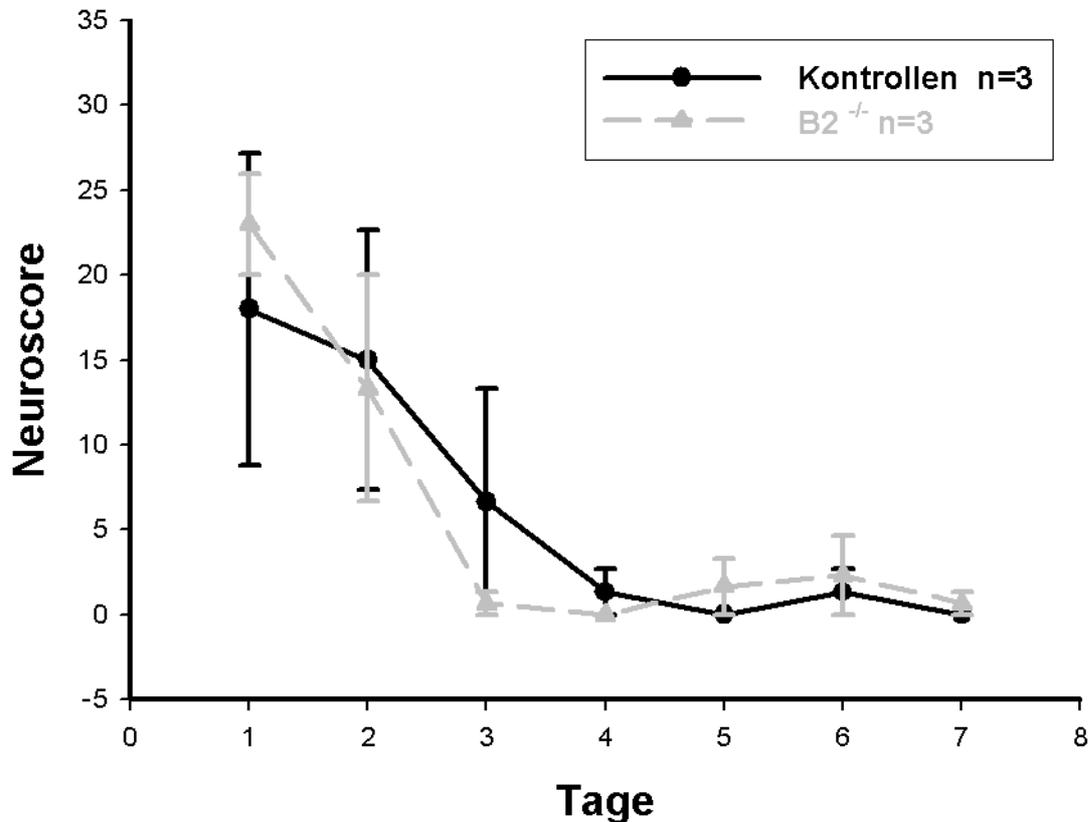


Abbildung 5: Neuroscore der den Beobachtungszeitraum überlebenden B2^{-/-}- und C57/Bl6-Mäuse

Den Beobachtungszeitraum von sieben Tagen haben nur C57/Bl6 Mäuse und Bradykinin-2 Rezeptor Knockout-Mäuse überlebt. Auch diese Tiere erfuhren ihre größte funktionelle Beeinträchtigung am ersten Tag nach der Subarachnoidalblutung. Sie hatten aber deutlich geringere neurologische Defizite als die Tiere derselben Versuchsgruppe, die innerhalb des Beobachtungszeitraumes verstarben.

Die Wildtyp-Mäuse, welche am siebten Tag nach SAB noch lebten hatten am ersten Tag nach SAB ein Defizit, das $18,0 \pm 9,2$ (MW \pm SEM) Punkten entsprach, im Vergleich dazu steht ein Punktwert von $42,8 \pm 12,8$ Punkten bei allen C57/Bl6 am ersten postoperativen Tag. Diese Beobachtung ließ sich auch in der Gruppe der B2^{-/-} Mäuse machen. Am ersten postoperativen Tag wurde ein Score von $23,0 \pm 3,0$ Punkten bei denjenigen B2^{-/-} Mäusen erhoben, die den Beobachtungszeitraum überlebten. Im Vergleich dazu hatten alle Tiere der B2^{-/-} Gruppe am ersten Tag nach der Blutung einen Neuroscore Wert von $34,0 \pm 5,8$ Punkten.

Obwohl die B2^{-/-} Mäuse am ersten postoperativen Tag einen um fünf Punkte höheren Neuroscore als

die Kontrolltiere hatten, erholten sie sich etwas schneller. Die C57/Bl6 Mäuse hatten am dritten Tag nach SAB $6,7 \pm 6,7$ Punkte im Neuroscore, bei den Bradykinin-2 Rezeptor defizienten Mäusen waren es $0,7 \pm 0,7$ Punkte. Allerdings war dieser Unterschied zu keinem Zeitpunkt signifikant.

Am Ende des Beobachtungszeitraumes hatten die C57/Bl6 Mäuse keinerlei durch den Neuroscore messbare neurologische Defizite mehr und einen Punktescore von null Punkten. Während die B2^{-/-} Mäuse noch ein geringes Defizit bei einem Punktwert von $0,7 \pm 0,7$ Punkten aufwiesen.

Es zeigte sich zu keinem Zeitpunkt ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen ($p=$ zwischen 0,7 und 1,0).

Im Bederson-Score zeigten die überlebenden Wildtyp-Mäuse schon am ersten Tag nach SAB keinerlei durch den Score messbare Defizite mehr. Die den Beobachtungszeitraum überlebenden B2^{-/-} Mäuse hatten $1,0 \pm 1,0$ Punkte, was dadurch zustande kam, dass eine B2^{-/-} Maus am siebten postoperativen Tag noch einen Bederson-Score von drei Punkten hatte, die übrigen Tiere hatten keine durch den Bederson-Score messbare neurologische Defizite mehr.

24 Stunden nach Induktion der Subarachnoidalblutung wurde der erste Neuroscore nach SAB durchgeführt. In die Auswertung konnten nur Mäuse einbezogen werden, die zu diesem Zeitpunkt noch lebten.

Am Todestag hatten die C57/Bl6 Mäuse im Mittel einen Neuroscore von 41,8 Punkten, die B1^{-/-} Mäuse hatten einen Score von 25,0 Punkten und die B2^{-/-} Mäuse hatten 27,3 Punkte. Das heißt die B1^{-/-} und B2^{-/-} Mäuse hatten am Todestag ein geringeres neurologisches Defizit als ihre Kontrollen. Obwohl alle B1^{-/-} Mäuse vor Beendigung des Beobachtungszeitraumes verstarben, hatten sie am Todestag von allen Gruppen das geringste durch den Neuroscore messbare neurologische Defizit.

Am Tag bevor die Tiere starben lag der Neuroscore bei den C57/Bl6 Mäusen durchschnittlich bei 47,8 Punkten während die B1^{-/-} Mäuse 29,1 Punkte und die B2^{-/-} Mäuse 24,0 Punkte hatten. Zu diesem Zeitpunkt wiesen die B2^{-/-} Mäuse im Intergruppenvergleich das geringste neurologische Defizit auf.

Die verstorbenen Kontrolltiere besaßen von allen Mäusen die größte neurologische Funktionsbeeinträchtigung. Die Unterschiede zwischen den Gruppen sind weder am Todestag, noch am Tag bevor die Tiere starben signifikant.

Neuroscore verstorbenen Mäuse

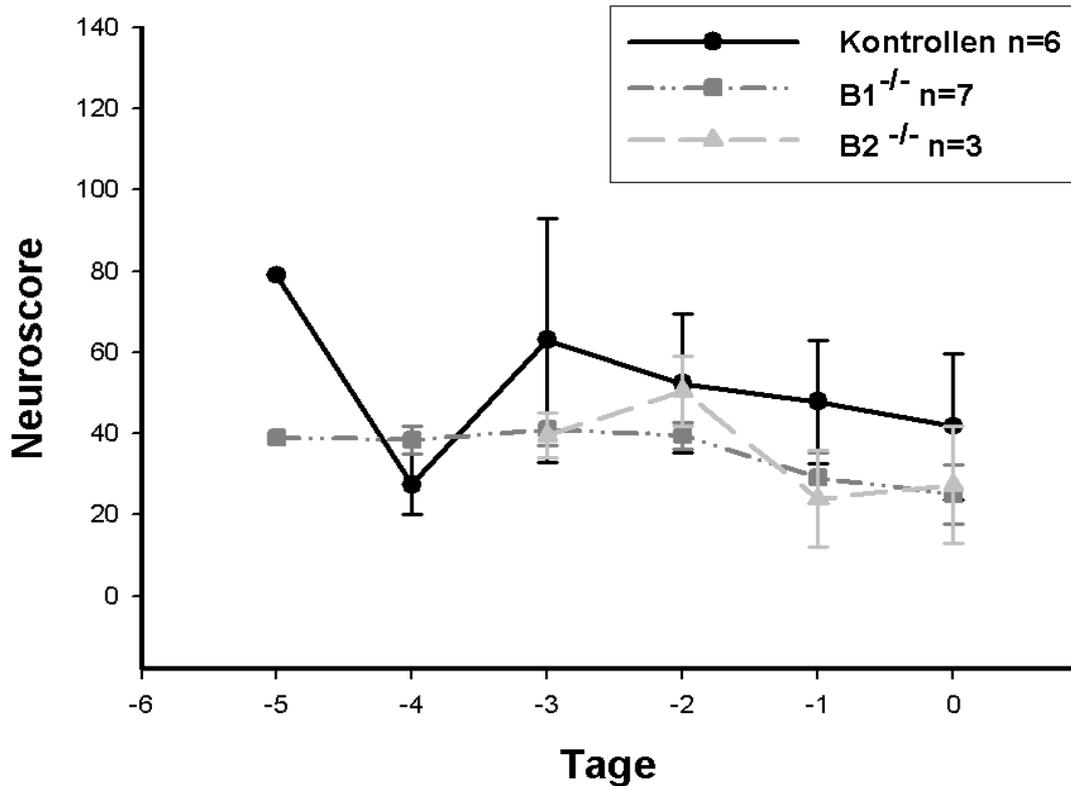


Abbildung 6: Neuroscore der während des Beobachtungszeitraumes verstorbenen B1^{-/-}, B2^{-/-} und C57/Bl6-Mäuse. In dieser graphischen Darstellung steht der Tag „0“ für den Tag, an dem die Mäuse verstorben sind.

Bederson-Score

Im Intergruppenvergleich aller Tiere präsentierten die Wildtyp-Mäuse im Bederson-Score die geringsten Defizite, sie hatten am ersten Tag nach SAB durchschnittlich 1,9 Punkte von fünf möglichen. Am dritten Tag nach der Blutung erhielten sie 1,3 und am fünften Tag 1,0 Punkte. Am siebten Tag hatten sie mit null Punkten kein durch den Bederson Test festzustellendes Defizit mehr. Dagegen hatten die B1^{-/-} Mäuse mit 3,7 Punkten am ersten Tag, 3,6 Punkten am dritten Tag und 4,2 Punkten am vierten Tag nach SAB deutlich größere Defizite. Die B2^{-/-} Tiere hatten an den ersten beiden Tagen nach der Blutung einen Punktescore von 3 bzw. 2 Punkten. In den folgenden Tagen verbesserten sich die Mäuse kontinuierlich, bis sie am sechsten Tag keine durch den Bederson-Score detektierbaren Defizite mehr hatten. Damit hatten die B1^{-/-} die höchste Punktzahl und das größte Defizit im Bederson-Score. Die Kontrollmäuse hatten die niedrigsten Scorewerte und das geringste Defizit. Ab dem dritten Tag nach Subarachnoidalblutung hatten C57/Bl6 und B2^{-/-} Mäuse ähnliche Ergebnisse im Bederson-Score.

Betrachtet man nun den Bederson-Score der überlebenden C57/Bl6 Mäuse stellt man fest, dass sie alle ab dem ersten Tag nach Subarachnoidalblutung einen Score von null Punkten und damit kein in diesem Test messbares neurologisches Defizit hatten. Dagegen hatten die C57/Bl6 Mäuse, die innerhalb der ersten 7 Tage starben, durchweg höhere Punktwerte im Bederson-Score und schwerwiegendere Defizite. Sie hatten am Todestag durchschnittlich drei Punkte und am Tag davor 2,8 Punkte.

Die Bradykinin-1 Rezeptor Knockout-Mäuse, die den Beobachtungszeitraum nicht überlebten, hatten am Todestag 3,1 Punkte, an den Tagen zuvor 3,1 bzw. 3,7 Punkte und am vierten Tag vor ihrem Exitus durchschnittlich 4,3 Punkte. Die B1^{-/-} präsentierten damit auch die größten Defizite im Bederson-Score der verstorbenen Mäuse.

Die während der sieben Tage verstorbenen B2^{-/-} Mäuse hatten am Todestag im Bederson-Score 2,7 Punkte und an den Tagen davor 1,5 bzw. 3,5 Punkte. Die B2 Rezeptor defizienten Mäuse, die den Beobachtungszeitraum überlebten hatten durchweg einen Punktwert von einem Punkt im Bederson-Score. Es existierten innerhalb der einzelnen Gruppen deutliche Unterschiede hinsichtlich neurologischer Defizite zwischen überlebenden und versterbenden Mäusen.

3.2.2.3 Gewichtsverlauf

Der Gewichtsverlauf der Mäuse wird grundsätzlich als ein Indikator für das Allgemeinbefinden der Tiere verstanden. Aus diesem Grund wurden täglich alle lebenden Tiere gewogen. Für die Bestimmung des Gewichtsverlaufes über sieben Tage wurden nur die Mäuse herangezogen, welche den kompletten Beobachtungszeitraum von sieben Tagen überlebten. Dies waren jeweils drei Mäuse in der Kontrollgruppe und in der B2^{-/-} Gruppe. Da alle Tiere in der B1^{-/-} Gruppe verstarben, ist diese Gruppe hier nicht vertreten.

Sowohl die Wildtyp-Mäuse, als auch die B2 Knockout-Mäuse zeigten in den ersten beiden Tagen nach SAB eine deutliche Gewichtsabnahme, wobei die C57/Bl6 Mäuse am ersten postoperativen Tag noch $89,1 \pm 2,3\%$ (MW \pm SEM), am zweiten und dritten Tag nach SAB $79,8 \pm 1,2\%$ und $75,5 \pm 2,5\%$ ihres Ausgangsgewichtes wogen. Die Wildtyp-Mäuse nahmen bis zum vierten postoperativen Tag ab und fingen am fünften Tag nach der Subarachnoidalblutung wieder an Gewicht zuzunehmen. Sie erreichten am siebten Tag $92,5 \pm 7,0\%$ ihres präoperativen Gewichtes.

Es gab statistisch signifikante Unterschiede hinsichtlich des Gewichtsverlaufes, was sich schon ab dem ersten Tag nach SAB bemerkbar machte, so unterschied sich das präoperative Ausgangsgewicht signifikant vom Gewicht am ersten ($p=0,003$), am zweiten ($p<0,001$) und am dritten Tag ($p<0,001$) nach Subarachnoidalblutung.

Gewichtsverlauf prozentual zum Ausgangsgewicht

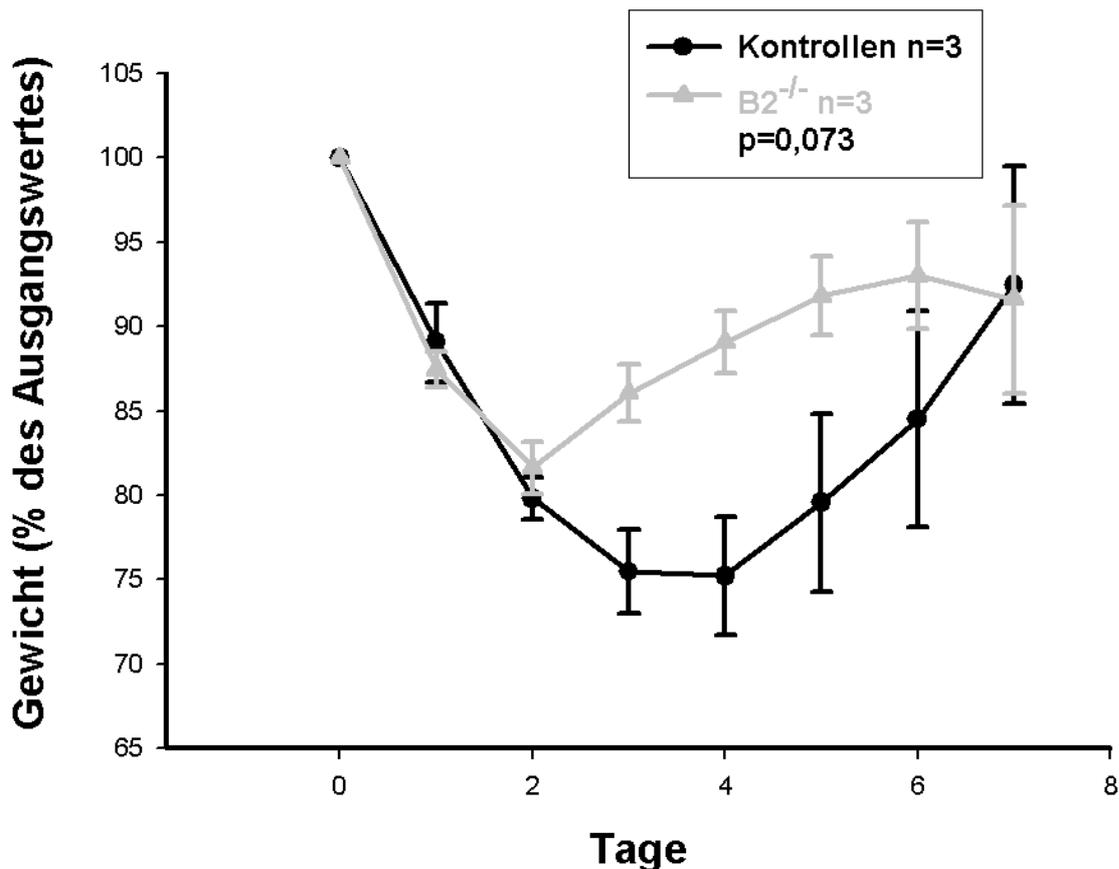


Abbildung 7: Gewichtsverlauf der B1^{-/-}, B2^{-/-}- und C57/Bl6-Mäuse prozentual zum Ausgangsgewicht

Außerdem gab es signifikante Gewichtsunterschiede innerhalb der Kontrollgruppe vom ersten zum zweiten Tag ($p=0,006$) und vom ersten zum dritten Tag ($p=0,002$). Vom zweiten zum dritten Tag nach SAB unterschied sich das Gewicht der C57/Bl6 nicht mehr signifikant innerhalb der Gruppe.

Die B2^{-/-} Mäuse wogen an den ersten drei Tagen post Subarachnoidalblutung $87,5 \pm 1,05\%$, $81,6 \pm 1,5\%$ und $86,1 \pm 1,7\%$ ihres Ausgangsgewichtes und fingen bereits am dritten Tag nach der Blutung wieder an zuzunehmen. Am siebten postoperativen Tag hatten die B2^{-/-} Mäuse $91,6 \pm 5,6\%$ ihres Ausgangsgewichtes wieder erreicht. Statistisch signifikante Unterschiede gibt es hinsichtlich des präoperativen Gewichts der Mäuse zum ersten ($p=0,012$), zweiten ($p<0,001$), dritten ($p=0,007$) und vierten ($p=0,024$) postoperativen Tag. Außerdem unterschied sich das Gewicht der B2^{-/-} Mäuse signifikant vom ersten zum zweiten ($p=0,042$) sowie vom zweiten ($p=0,049$) zum dritten Tag nach SAB, jedoch nicht mehr von dritten zum vierten Tag nach der Blutung. Im Intergruppenvergleich lassen sich statistisch signifikante Unterschiede für den dritten ($p=0,024$) und vierten ($p=0,025$) Tag nach Subarachnoidalblutung belegen.

Gewichtsverlauf prozentual zum Vortag

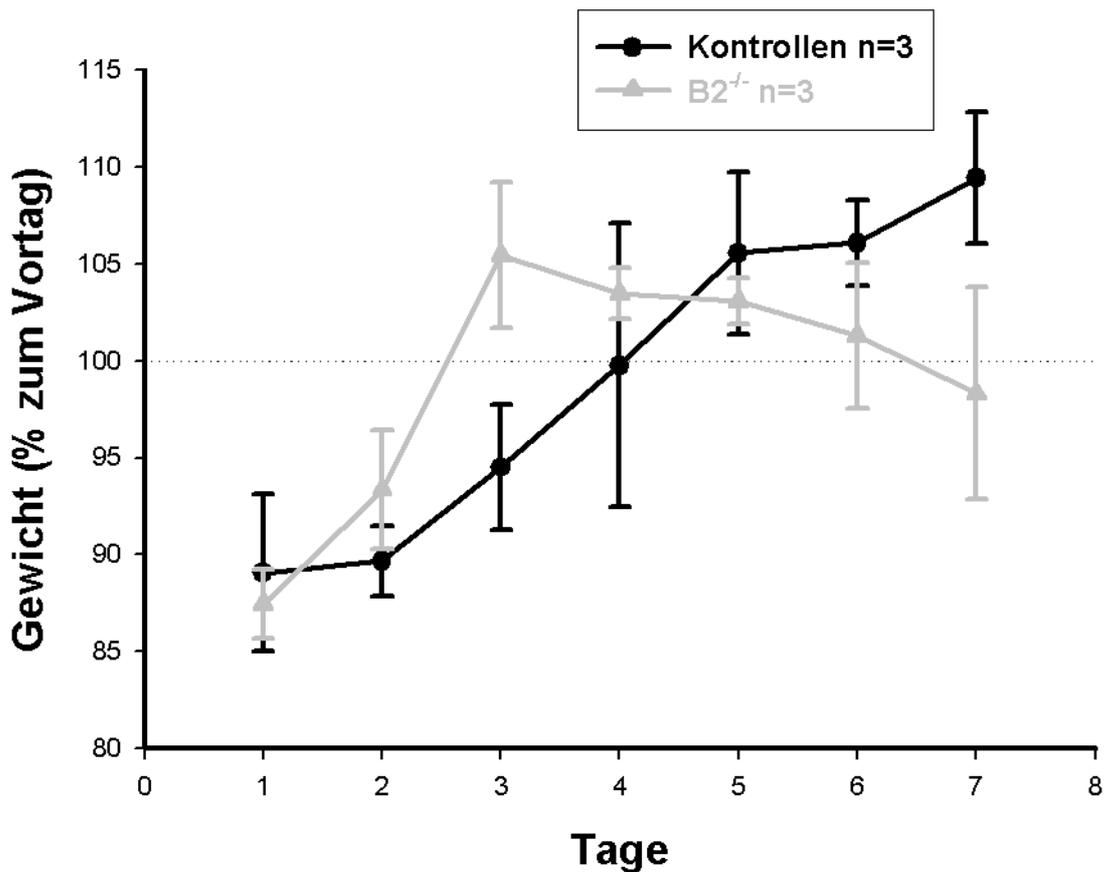


Abbildung 8: Gewichtsverlauf der B1^{-/-}, B2^{-/-} und C57/Bl6-Mäuse prozentual zum Vortag

Betrachtet man den Gewichtsverlauf im Vergleich zum Vortag, wird noch deutlicher, dass sich die B2^{-/-} Mäuse hinsichtlich ihres Gewichtes schneller wieder erholten und bereits am dritten Tag wieder begannen zuzunehmen. Die C57/Bl6 Mäuse nahmen bei genauer Betrachtung erst am fünften Tag wieder zu. Am vierten Tag nahmen sie im Vergleich zu den ersten drei postoperativen Tagen lediglich weniger stark ab. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den beiden Gruppen lassen sich für den dritten ($p=0,018$) und siebten ($p=0,040$) Tag nach der Blutung feststellen.

Gewichtsverlauf gestorbener Mäuse

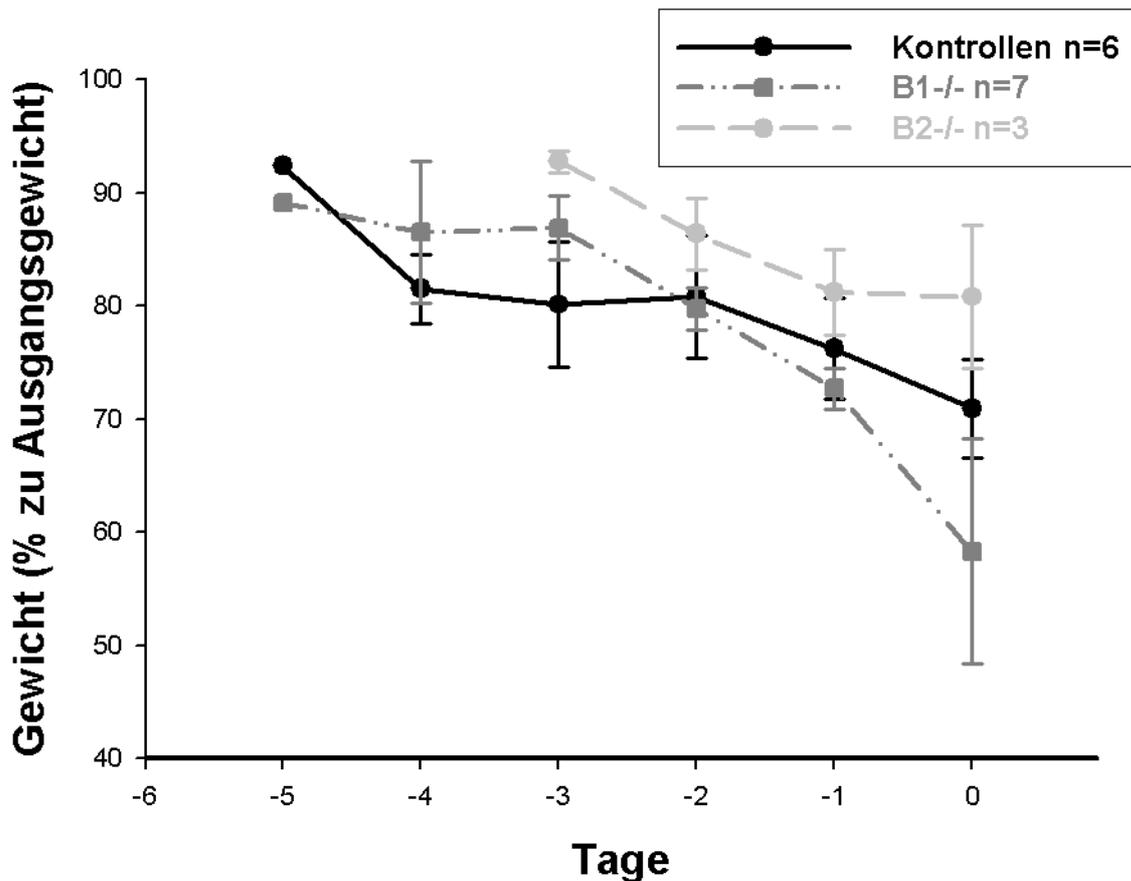


Abbildung 9: Gewichtsverlauf während des Beobachtungszeitraumes verstorbener $B1^{-/-}$, $B2^{-/-}$ und C57/B16- Mäuse

Hier ist das Gewicht der Mäuse dargestellt, die innerhalb des Beobachtungszeitraumes von sieben Tagen nach Induktion der Subarachnoidalblutung verstarben, also das Gewicht zwischen Operation und Todeszeitpunkt. Dabei sind die Daten in Prozent des Ausgangsgewichtes vor der Operation ausgedrückt. Auch hier kann man sehen, dass die $B2^{-/-}$ Mäuse prozentual zu ihrem Ausgangsgewicht zwar Gewicht verloren, jedoch weniger als die anderen Gruppen. Zum Todeszeitpunkt hatten die $B2^{-/-}$ Tiere ein durchschnittliches Gewicht von $80,5\% \pm 6,4\%$ ihres Ausgangsgewichtes, im Vergleich dazu wogen die $B1^{-/-}$ Mäuse im Durchschnitt $67,4\% \pm 2,2\%$ und die Kontrollen $71,0\% \pm 4,3\%$ ihres präoperativen Gewichtes. Der Gewichtsunterschied war allerdings nicht statistisch signifikant.

3.3 Beobachtungen über 24 Stunden nach Subarachnoidalblutung

Im zweiten Teil der Bradykininversuche wurden bei $B1^{-/-}$, $B2^{-/-}$ und C57/Bl6 Mäusen 24 Stunden nach Induktion der Subarachnoidalblutung Gewicht, neurologische Defizite und ICP erhoben und anschließend die Gehirne für die Ödembestimmung entnommen.

3.3.1 Pathophysiologische Veränderungen zum Zeitpunkt der experimentellen SAB

3.3.1.1 Anstieg des intrakraniellen Druckes

Wie auch bei den Mäusen der anderen Versuchsreihe war der intrakranielle Druck vor Induktion der Subarachnoidalblutung nicht erhöht.

ICP Verlauf

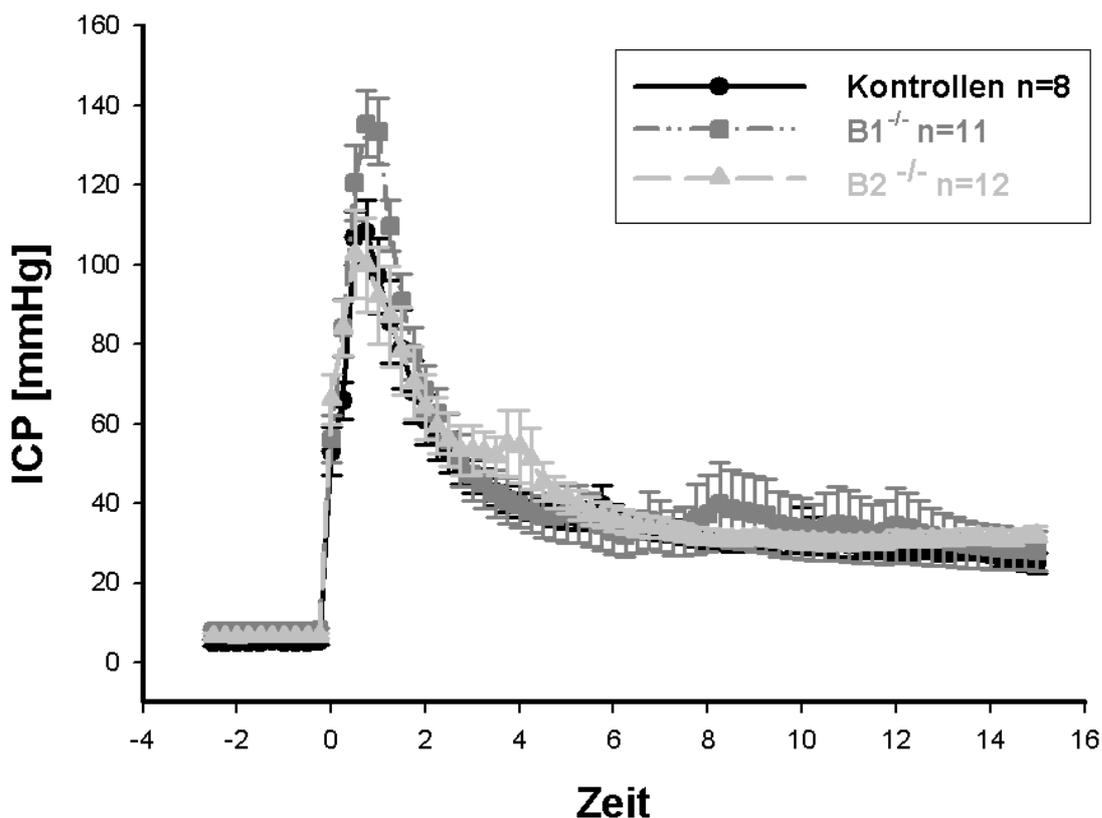


Abbildung 10: ICP-Verlauf der $B1^{-/-}$, $B2^{-/-}$ und C57/Bl6-Mäuse, deren Gehirne zur Ödembestimmung entnommen wurden. Der Zeitpunkt "0" markiert die Induktion der SAB

In der Kontrollgruppe betrug der ICP vor SAB $5,0 \pm 0,0$ mmHg (MW \pm SEM), in der Gruppe der B1^{-/-} Mäuse $7,8 \pm 0,0$ mmHg und in der Gruppe der B2^{-/-} Mäuse $6,6 \pm 0,0$ mmHg.

Der schnelle ICP Anstieg nach der Gefäßperforation zwischen A. cerebri media und anterior gipfelte in Spitzenwerten von 108,2 mmHg in der Kontrollgruppe, 135,4 mmHg bei den Bradykinin-1 Rezeptor Knockout-Mäusen und 102,6 mmHg bei den B2^{-/-} Mäusen, wobei kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen bestand.

Nach Erreichen des mittleren arteriellen Druckes siehe 3.2.1.1 kam es in allen Gruppen zu einem Abfall des intrakraniellen Druckes, was einem Sistieren der Blutung entspricht. 15 Minuten nach Induktion der Subarachnoidalblutung war der ICP bei den C57/Bl6 Mäusen auf $25,0 \pm 2,5$ mmHg, bei den B1^{-/-} auf $28,2 \pm 5,0$ mmHg und bei den B2^{-/-} Tieren auf $32,3 \pm 1,8$ mmHg gesunken. Auch zu diesem Zeitpunkt existierten keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen.

3.3.1.2 Abfall der cerebralen Durchblutung

Während des ICP Anstieges kam es zum Abfall der lokalen cerebralen Durchblutung, was sich im Abfall der Laser-Doppler-Werte widerspiegelte.

In der Kontrollgruppe war ein Abfall der lokalen cerebralen Durchblutung auf 23,0% des Ausgangswertes, bei den B1^{-/-} Mäusen auf 13,8% und bei den B2^{-/-} Mäusen auf 24,0% des Ausgangswertes zu messen. In der zweiten Minute nach Einsetzen der Subarachnoidalblutung begannen sich die LDF-Werte wieder zu erholen.

Die B2^{-/-} Mäuse erreichten in der zehnten Minute nach SAB ihren Ausgangswert von 99,2% wieder, 15 Minuten nach SAB betrug die cerebrale Durchblutung in dieser Gruppe 75,3% des Ausgangswertes. Die cerebrale Perfusion in den B1-Rezeptor Knockout-Mäusen hingegen erreichte maximal 67,1% der Perfusion vor SAB, 15 Minuten nach Induktion der Blutung lag die Durchblutung bei 42,7% des Ausgangswertes. Bei den C57/Bl6 Mäusen betrug die cerebrale Perfusion 15 Minuten nach SAB 58,1% der initialen Perfusion, damit haben diese Mäuse ihre Ausgangsperfusion ebenfalls nicht wieder erreicht. Es ließen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen nachweisen.

Cerebrale Perfusion

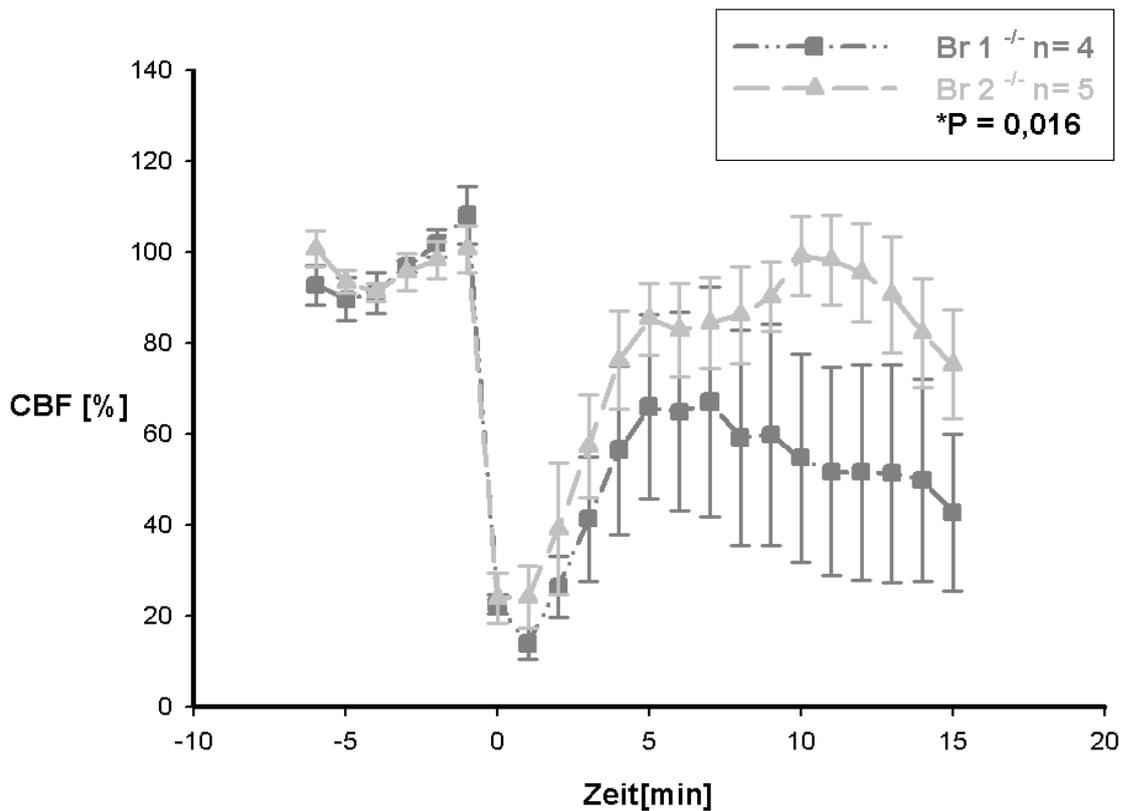


Abbildung 11: Cerebraler Blutfluss der $B1^{-/-}$, $B2^{-/-}$ und C57/Bl6-Mäuse, deren Gehirne zur Ödembestimmung entnommen wurden. Der Zeitpunkt "0" markiert die Induktion der SAB

3.3.2 Untersuchungen 24 Stunden nach Subarachnoidalblutung

3.3.2.1 Überleben

Innerhalb der ersten 24 Stunden nach Auslösen der Subarachnoidalblutung starb keine der sieben C57/Bl6 Mäuse und keine der zwölf Bradykinin-2 Rezeptor Knockout-Mäuse, aber zwei der sieben $B1^{-/-}$ Mäuse. Daraus ergibt sich eine Mortalität für die ersten 24 Stunden nach SAB von null Prozent in der Kontroll- und $B2^{-/-}$ Gruppe sowie eine Mortalität von 40% in der $B1^{-/-}$ Gruppe.

3.3.2.2 Neurologische Funktionen

Neurologische Defizite der Mäuse nach Subarachnoidalblutung wurden auch in dieser Versuchsreihe, wie unter 2.2.8.1 beschrieben, mittels zweier neurologischer Tests erhoben.

Die C57/Bl6 Kontrollmäuse hatten nach 24 Stunden durchschnittlich $34,1 \pm 10,7$ Punkte im Neuroscore und $2,0 \pm 0,4$ Punkte im Bederson-Score, wobei 71,4% der C57/Bl6 Mäuse mit zwei Punkten im Bederson-Score ein geringfügiges neurologisches Defizit zeigten, welches mit einer

Standinstabilität einherging. 14,3% der Kontrollmäuse wiesen mit null Punkten im Bederson Test normale neurologische Funktionen auf und weitere 14,3% zeigten ein, mit vier Punkten bewertetes, spontanes „Circling“.

In der B1-Rezeptor defizienten Gruppe hatten die Mäuse mit durchschnittlich $60,5 \pm 7,5$ Punkten im Neuroscore und $3,0 \pm 0,7$ Punkten im Bederson-Score deutlich größere neurologische Defizite, was jedoch nicht statistisch signifikant war ($p=0,077$). 16,7% der B1^{-/-} Mäuse hatten mit einem Punkt im Bederson-Score, bis auf einen eingeschränkten Stellreflex, einen nahezu normalen neurologischen Status, 33,3% hatten mit zwei Punkten geringfügige neurologische Einschränkungen mit einer Standataxie, 16,7% der B1^{-/-} Mäuse wiesen ein mit 3 Punkten bewertetes, mittelschweres Defizit und 33,3% ein schweres, mit fünf Punkten bewertetes, neurologisches Defizit ohne jede Spontanbewegung auf.

Von der Gesamtpunktzahl ausgehend, hatten die Bradykinin-1 Rezeptor defizienten Mäuse das schwerste neurologische Defizit, während sich die B2^{-/-} Mäuse mit $43,4 \pm 9,2$ Punkten im Neuroscore und $3,1 \pm 0,6$ Punkten im Bederson-Score hinsichtlich der Beeinträchtigung durch die Blutung zwischen den Kontrollen und den B1^{-/-} Mäusen befanden.

In der Gruppe der Bradykinin-2 Rezeptor Knockout-Mäuse präsentierten 16,7% normale neurologische Funktionen, 33,3% ein geringes Defizit mit zwei Punkten, 8,3% spontane Kreisbewegungen, die mit vier Punkten bewertet wurden und 41,7% keine Spontanbewegung und ein schweres Defizit, wofür fünf Punkte im Bederson-Score vergeben wurden. Hinsichtlich der neurologischen Fähigkeiten ergeben sich keine statistisch signifikanten Unterschiede.

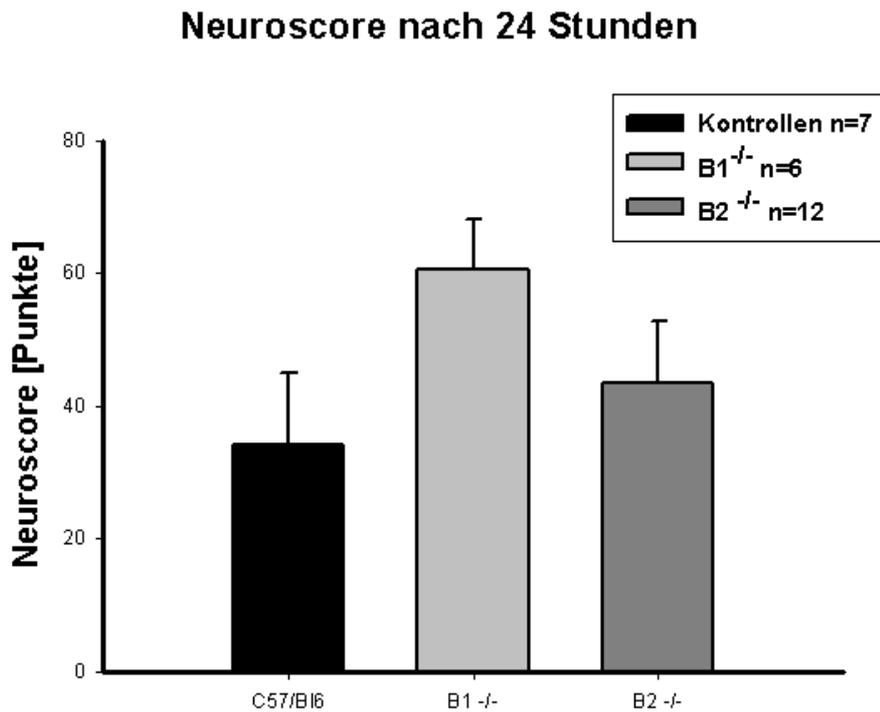


Abbildung 12: Neuroscore der B1^{-/-}, B2^{-/-} und C57/Bl6-Mäuse nach 24 Stunden

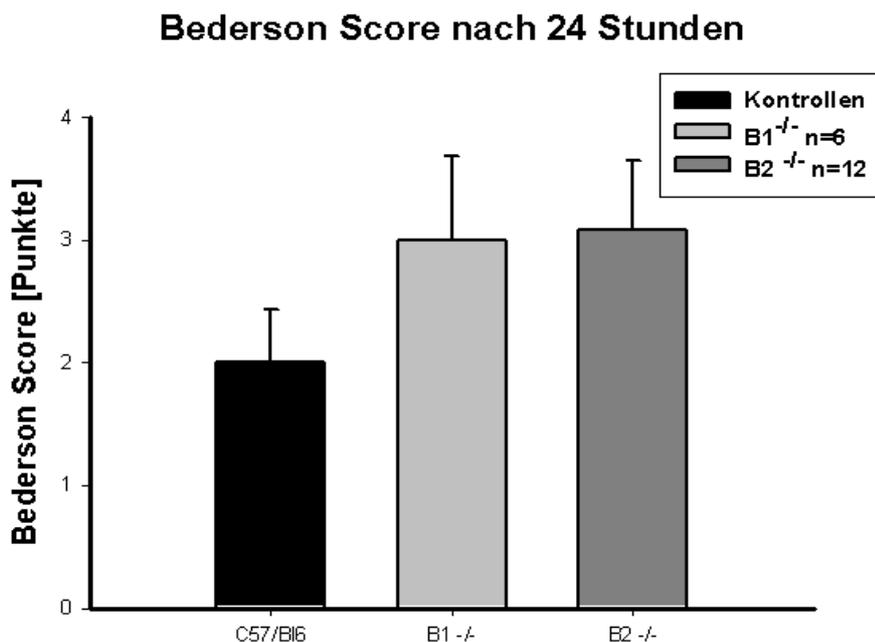


Abbildung 13: Bederson-Score der B1^{-/-}, B2^{-/-} und C57/Bl6-Mäuse nach 24 Stunden

3.3.2.3 Gewichtsverlauf

Binnen 24 Stunden nach SAB hatten alle Tiere an Gewicht verloren. Die Unterschiede zwischen den Gruppen waren aber nicht signifikant. So wogen die Kontrolltiere am ersten postoperativen Tag $88,91 \pm 0,01$ %, die B1^{-/-} Mäuse $87,86 \pm 0,02$ % und die B2^{-/-} Mäuse $88,67 \pm 0,01$ % ihres Ausgangsgewichtes.

3.3.2.4 Bestimmung des ICP 24 Stunden nach Subarachnoidalblutung

Wie unter 2.2.9 beschrieben, wurde 24 Stunden nach Induktion der Subarachnoidalblutung erneut eine ICP Messung über 15 Minuten durchgeführt. Dabei betrug der initiale intrakranielle Druck nach Einführen der Sonde bei den C57/Bl6 Mäusen $11,0 \pm 1,2$ mmHg (MW \pm SEM), bei den B1^{-/-} Mäusen $9,3 \pm 1,3$ mmHg und bei den B2^{-/-} Mäusen $7,9 \pm 2,2$ mmHg. Der ICP stieg in allen drei Gruppen im Laufe der Messung an und befand sich am Ende der Messung bei $16,9 \pm 1,0$ mmHg in der Kontrollgruppe, bei $15,0 \pm 2,1$ mmHg in der B1^{-/-} Gruppe und bei $13,9 \pm 3,2$ mmHg in der B2^{-/-} Gruppe. Die B2^{-/-} Mäuse hatten signifikant niedrigere ICP Werte nach 24 Stunden ($p < 0,001$).

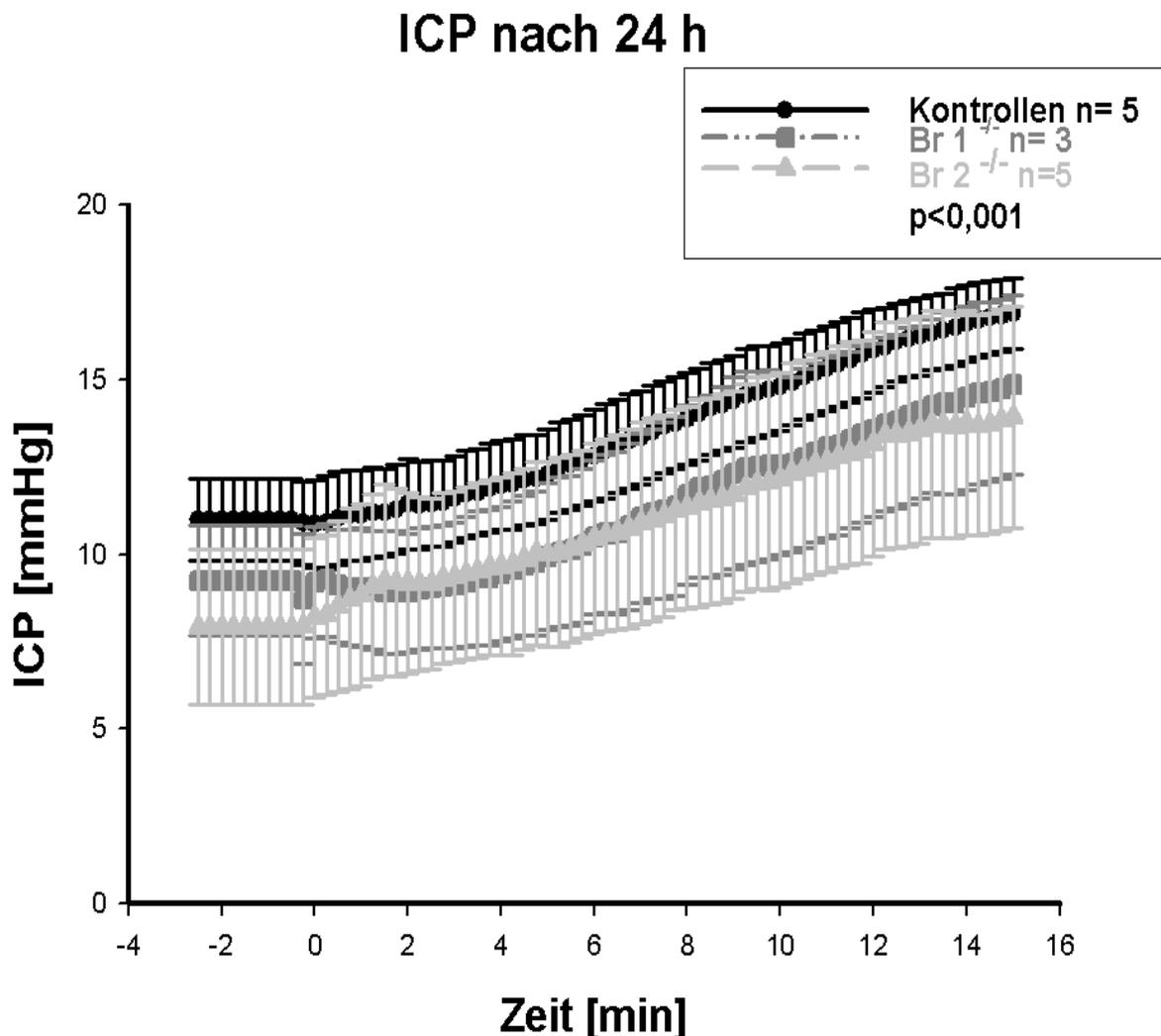


Abbildung 14: ICP-Verlauf der B1^{-/-}, B2^{-/-} und C57/Bl6-Mäuse 24 Stunden nach Induktion der SAB

3.3.2.5 Bestimmung des Hirnwassergehaltes 24 Stunden nach Subarachnoidalblutung

Da eine Aktivierung des Kallikrein-Kinin Systems eine Erhöhung der Gefäßpermeabilität zur Folge haben kann wurde 24 Stunden nach Induktion der Subarachnoidalblutung das Hirnödem durch gravimetrische Bestimmung des Hirnwassergehaltes ermittelt. Das Hirnödem entspricht einer Zunahme des Hirnvolumens, welche in erster Linie durch eine Zunahme des Hirnwassergehaltes bedingt ist. Aus diesem Grund wurde 24 Stunden nach SAB der Wassergehalt der entnommenen Gehirne als die Differenz zwischen deren Feucht- und Trockengewicht bestimmt.

Der Hirnwassergehalt der Kontrollgruppe lag in der linken Hemisphäre im Mittel bei $79,9 \pm 0,7\%$. In der kontralateralen rechten Hemisphäre, in welcher die Subarachnoidalblutung ausgelöst wurde betrug der Hirnwassergehalt $80,8 \pm 0,4\%$. Daraus ergibt sich ein Hirnwassergehalt von durchschnittlich $80,4\%$ beider Hemisphären. Für die B1^{-/-}Mäuse wurde nach 24 Stunden ein Hirnwassergehalt von $78,8 \pm 0,8\%$ in der linken und $78,9 \pm 0,3\%$ in der rechten Hemisphäre ermittelt, beide Hemisphären zusammen haben einen durchschnittlichen Wassergehalt von $78,8\%$, was für ein geringer ausgeprägtes Ödem spricht. Die B2^{-/-} Mäuse hatten insgesamt den geringsten Hirnwassergehalt bei insgesamt $77,9\%$.

3.4 Einfluss von Matrix-Metalloproteinase-9 auf die Entstehung des frühen Hirnschadens nach Subarachnoidalblutung

3.4.1 Pathophysiologische Veränderungen zum Zeitpunkt der experimentellen SAB

3.4.1.1 Anstieg des intrakraniellen Druckes

Bei normalen ICP Werten zu Beginn der Operation von $5,4 \pm 0,1$ mmHg (MW \pm SEM) in der Kontrollgruppe und $5,7 \pm 0,0$ mmHg (MW \pm SEM) in der Gruppe der MMP-9 Knockout-Mäuse kam es durch das Auslösen der Subarachnoidalblutung, wie unter 2.2.4 beschrieben, zu einem abrupten Anstieg des intrakraniellen Druckes. Der ICP Anstieg erreichte innerhalb der ersten Minute nach cerebraler Gefäßperforation ein Maximum, dem in der Kontrollgruppe der FVB/N Mäuse der ICP Wert von $111,2 \pm 8,9$ mmHg und in der Gruppe der MMP-9 defizienten Mäuse der ICP Wert von $128,0 \pm 6,3$ mmHg entsprach. Nach Erreichen des mittleren arteriellen Druckes, dem dieser ICP letztendlich entsprach, kam es zu einem Abfall der ICP Werte in der zweiten Minute nach Blutungsbeginn. 15 Minuten nach SAB erholte sich der intrakranielle Druck bei den FVB/N Mäusen auf durchschnittlich $30,4 \pm 2,1$ mmHg und bei den MMP-9 Knockout-Mäusen auf $31,0 \pm 2,9$ mmHg.

ICP Verlauf MMP-9^{-/-} und Kontrollen

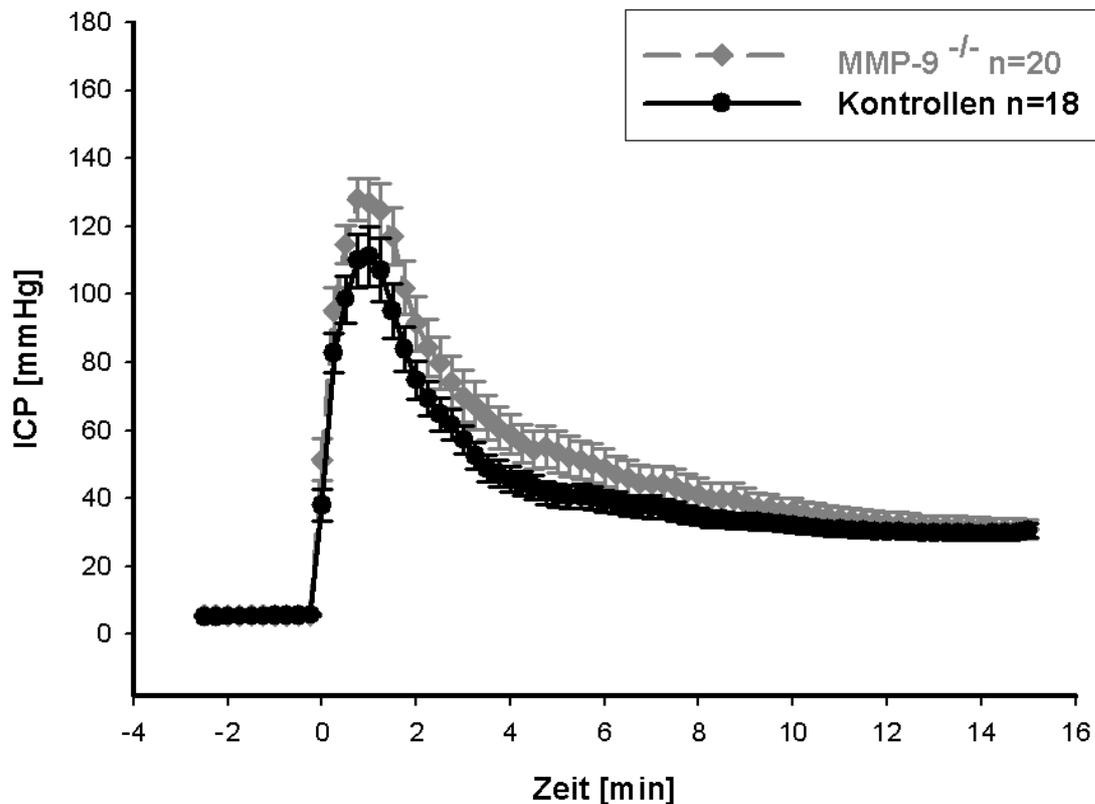


Abbildung 15: ICP-Verlauf der MMP-9^{-/-} Mäuse und ihrer Kontrollen. Der Zeitpunkt "0" markiert die Induktion der SAB

Weder zu Beginn der ICP Aufzeichnung, noch zum Zeitpunkt der Subarachnoidalblutung oder am Ende der ICP Messung unterschieden sich die ICP Werte der Gruppen signifikant voneinander.

3.4.1.2 Abfall der cerebralen Durchblutung

Mit dem Anstieg des intrakraniellen Druckes war auch bei den MMP-9^{-/-} Mäusen und ihren Kontrollen zum Zeitpunkt der Subarachnoidalblutung ein signifikanter Abfall ($p < 0,005$) der cerebralen Durchblutung zu beobachten. Dementsprechend fiel diese bei den FVB/N Mäusen von einem Ausgangswert von 97,5% vor SAB auf einen Wert von $28,1\% \pm 4,9\%$ zum Zeitpunkt der Gefäßperforation ab. Das Minimum war in der Kontrollgruppe eine Minute nach Induktion der Blutung erreicht und einem LDF Wert von $17,6\% \pm 5,3\%$ des Ausgangswertes zugeordnet. Danach erholte sich der CBF wieder und entsprach 15 Minuten nach Induktion der Subarachnoidalblutung einem Wert von $62,2\% \pm 8,2\%$ des Ausgangswertes, wobei der Ausgangswert nicht wieder erreicht wurde.

CBF MMP9^{-/-} und Kontrollen

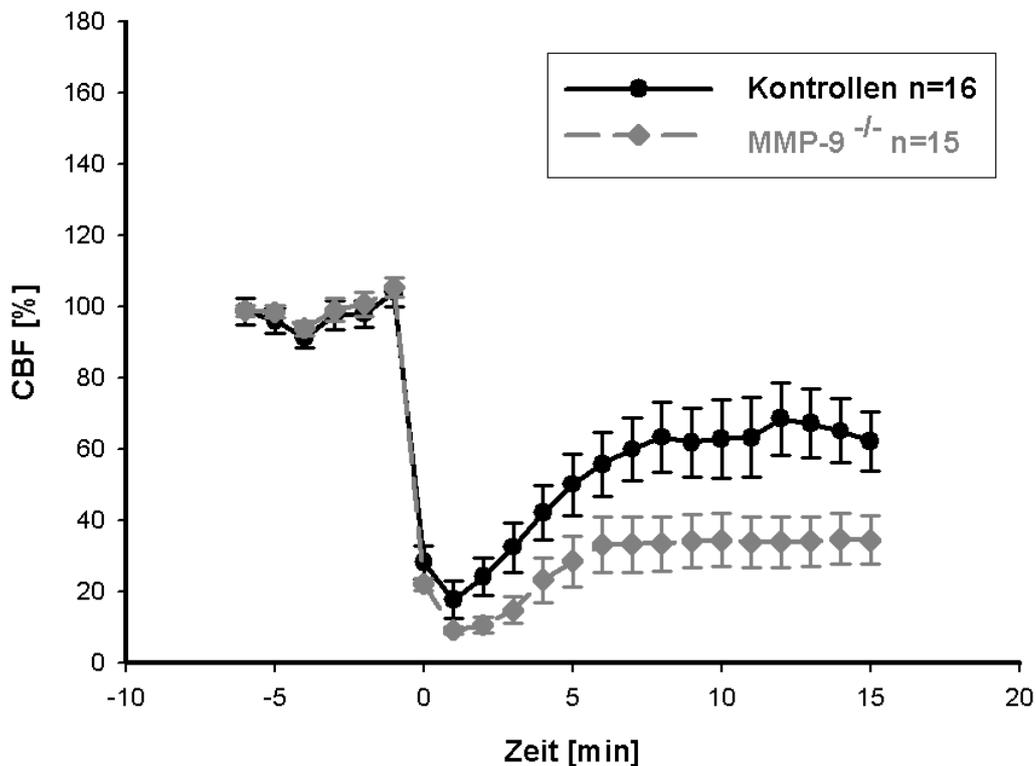


Abbildung 16: Cerebraler Blutfluss der MMP-9^{-/-} Mäuse und ihrer Kontrollen prozentual zum Ausgangswert. Der Zeitpunkt "0" markiert die Induktion der SAB

Bei den MMP-9^{-/-} Mäusen war ein ähnlicher LDF Verlauf zu verzeichnen, die cerebrale Durchblutung fiel von 99,3% ± 1,5% auf 22,0% ± 1,7% zum Zeitpunkt der Gefäßperforation ab, wobei auch in dieser Gruppe der CBF weiter abnahm und eine Minute nach induzierter SAB den Tiefstwert von 9,2% ± 1,1% des Ausgangswertes vor SAB erreichte. 15 Minuten nach SAB hatten die MMP-9 Knockout-Mäuse einen LDF von 34,5% ± 6,7% des Ausgangswertes.

Es gibt keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen bezüglich des CBF vor, zum Zeitpunkt der SAB oder eine Minute nach SAB. Ab der dritten Minuten nach SAB lassen sich jedoch statistisch signifikante Unterschiede zwischen MMP-9^{-/-} und Kontrollen ermitteln, welche auch am Ende der LDF Aufzeichnung 15 Minuten nach Subarachnoidalblutung noch bestehen. (3. Minute p=0,011, 4. Minute p=0,023, 5. Minute p=0,038, nach 15 Minuten p=0,019).

3.4.2 Postoperatives Outcome über sieben Tage nach Subarachnoidalblutung

3.4.2.1 Überleben

Die postoperative Mortalität über sieben Tage lag in der Kontrollgruppe bei 28,6%, wobei von sieben operierten Tieren ein Tier am zweiten Tag und ein Tier am dritten Tag nach induzierter Subarachnoidalblutung verstarb. Fünf der sieben Mäuse überlebten bis zum siebten Tag.

In der Gruppe der MMP-9 defizienten Mäuse verstarben insgesamt drei von sieben Tieren während des Beobachtungszeitraumes von sieben Tagen nach der Operation, woraus sich eine Mortalität von 42,9% ergibt. Zwei MMP-9 Knockout-Mäuse starben innerhalb der ersten 48 Stunden nach Subarachnoidalblutung, eine weitere starb am dritten Tag.

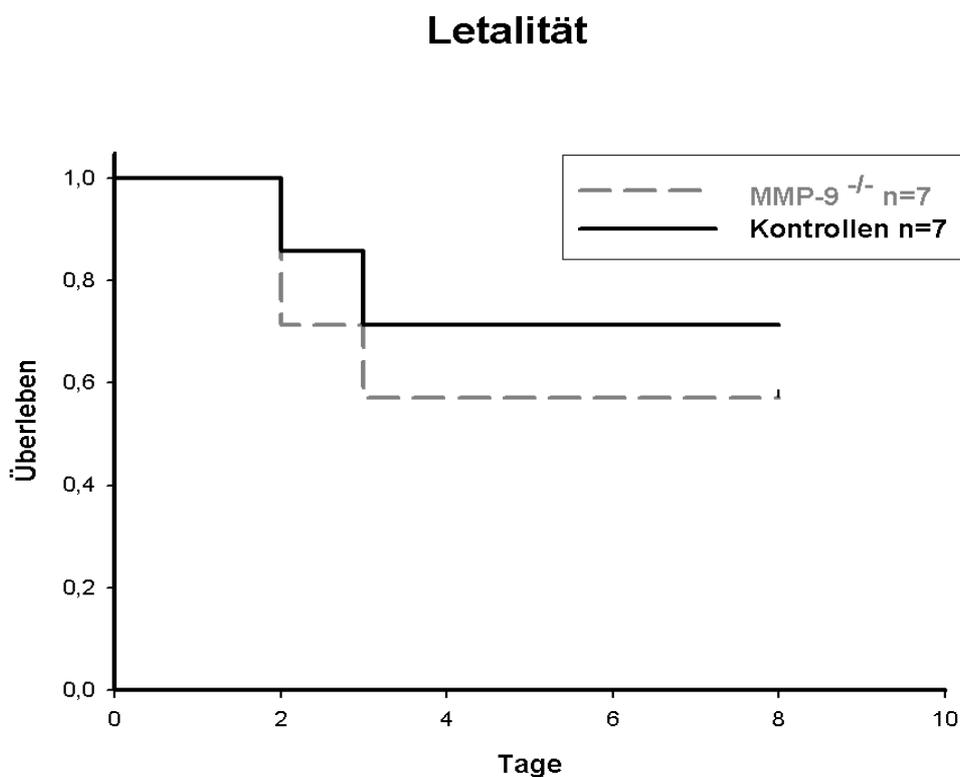


Abbildung 17: Überlebenskurve der MMP-9^{-/-} Mäuse und ihrer Kontrollen

3.4.2.2 Neurologische Funktionen

Während des postoperativen Beobachtungszeitraumes wurde täglich der neurologische Status der Tiere, wie bereits unter 2.2.8.1 beschrieben, mittels Neuro-, NSS- und Bederson-Score erhoben, um eventuelle neurologische Defizite und Funktionsstörungen objektiv erfassen zu können.

Das Maximum der funktionellen Beeinträchtigung der Tiere, die den Beobachtungszeitraum überlebten, fiel, wie auch bei den Bradykinin Knockout-Mäusen und ihren Kontrollen, auf den

ersten postoperativen Tag. Zu diesem Zeitpunkt hatten die Kontrollen durchschnittlich $64,9 \pm 20,3$ Punkte und die MMP-9^{-/-} Mäuse $50,3 \pm 13,5$ Punkte im Neuroscore.

Nach 48 Stunden war eine deutliche Erholung festzustellen, die sich in einem Abfall des Scores auf $16,0 \pm 4,8$ Punkte in der Kontrollgruppe und auf $26,3 \pm 9,2$ Punkte in der MMP-9^{-/-} Gruppe manifestierte. Obwohl die Kontrolltiere einen höheren Ausgangswert hatten, erholten sich nach den ersten 24 Stunden insgesamt etwas schneller, was sich auch in den Punktwerten des zweiten und dritten Tages widerspiegelte. Ab dem vierten postoperativen Tag erholten sich die MMP-9^{-/-} Mäuse besser. Dies zeichnete sich auch im Neuroscore ab, die MMP-9^{-/-} Mäuse hatten zu diesem Zeitpunkt $3,3 \pm 1,8$ Punkte und die FVB/N Mäuse $6,2 \pm 3,0$ Punkte.

Diese Entwicklung lässt sich auch den anderen Scores entnehmen, welche im Folgenden tabellarisch zusammengefasst sind:

Tabellen der den Beobachtungszeitraum überlebenden Tiere

Neuroscore Punktwert \pm SEM

	Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 4	Tag 5	Tag 6	Tag 7
FVB/Ncr1	$64,9 \pm 20,3$	$16,0 \pm 4,8$	$11,6 \pm 4,9$	$6,2 \pm 3,0$	$2,8 \pm 1,4$	$3,3 \pm 1,5$	$3,0 \pm 1,4$
MMP-9 ^{-/-}	$50,3 \pm 13,5$	$26,3 \pm 9,2$	$17,0 \pm 8,1$	$3,3 \pm 1,8$	$2,1 \pm 1,2$	$0,3 \pm 0,3$	0 ± 0

Tabelle 6: Ergebnisse des Neuroscores der den Beobachtungszeitraum überlebenden Tiere

Während der sieben Tage gab es statistisch signifikante Unterschiede hinsichtlich der Neuroscore Werte innerhalb der MMP-9^{-/-} Gruppe. Die neurologischen Funktionen, welche im Neuroscore untersucht wurden unterschieden sich signifikant, wenn man den ersten Tag allen anderen Tagen gegenüberstellte. Gleiches galt für den zweiten Tag, mit einer Ausnahme, die neurologischen Status am zweiten und dritten Tag nach der Blutung unterschieden sich nicht signifikant. Die Unterschiede im Neuroscore am dritten Tag waren wieder signifikant gegenüber dem vierten, fünften, sechsten und siebten Tag. Allerdings gab es keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen.

NSS Score \pm SEM

	Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 4	Tag 5	Tag 6	Tag 7
FVB/Ncr1	$11,9 \pm 3,2$	$4,6 \pm 1,2$	$4,8 \pm 2,5$	$3,2 \pm 1,4$	$2,2 \pm 0,9$	$2,1 \pm 0,8$	$1,6 \pm 0,8$
MMP-9 ^{-/-}	$13,3 \pm 2,5$	$8,0 \pm 2,7$	$5,5 \pm 2,6$	$0,8 \pm 0,5$	$0,1 \pm 0,1$	$0,3 \pm 0,3$	0 ± 0

Tabelle 7: Ergebnisse des NSS Scores der den Beobachtungszeitraum überlebenden Tiere

Die Erholung der neurologischen Funktionen, welche durch den NSS Score detektiert wurden, unterschieden sich vom ersten zum zweiten Tag nach Subarachnoidalblutung und vom ersten Tag zu allen anderen Tagen signifikant.

Bederson-Score \pm SEM

	Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 4	Tag 5	Tag 6	Tag 7
FVB/Ncr1	3,0 \pm 1,2	2,0 \pm 0,8	1,4 \pm 0,9	1,2 \pm 0,7	0,6 \pm 0,6	1,2 \pm 0,7	1,2 \pm 0,7
MMP-9 ^{-/-}	2,3 \pm 1,3	1,0 \pm 1,0	1,0 \pm 1,0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0

Tabelle 8: Ergebnisse des Bederson-Scores der den Beobachtungszeitraum überlebenden Tiere

Im Bederson-Score hatten die MMP-9^{-/-} Mäuse vom ersten postoperativen Tag an weniger, durch diesen Score detektierte neurologische Defizite, was sich jedoch nicht als statistisch signifikant erwies.

Die Unterschiede zwischen den Gruppen wurden im Verlauf der sieben Tage immer geringer.

Was die innerhalb des Beobachtungszeitraumes verstorbenen Mäuse betrifft, hatten die MMP-9^{-/-} Mäuse vor ihrem Tod mit 64,3 \pm 21,2 Punkten geringere funktionelle Defizite im Neuroscore als ihre Kontrollen mit 94,5 \pm 3,5 Punkten. Auch im Bederson-Score schnitten die MMP-9^{-/-} mit 3,0 \pm 1,5 Punkten besser ab als ihre Kontrollen mit 5,0 \pm 0,0 Punkten.

Am ersten Beobachtungstag nach SAB hatten die, den Beobachtungszeitraum überlebenden, FVB/N Mäuse durchschnittlich 3,0 \pm 1,2 Punkte und die MMP-9^{-/-} Mäuse 2,3 \pm 1,3 (MW \pm SEM) Punkte im Bederson-Score. Bereits am zweiten Tag nach Induktion der SAB gingen die, durch den Score bewerteten, Defizite auf 2,0 \pm 0,8 Punkte in der FVB/N Gruppe und auf 1,0 \pm 1,0 Punkte in der MMP-9^{-/-} Gruppe zurück. Ab dem vierten Tag nach der Subarachnoidalblutung zeigten die MMP-9 Knockout-Mäuse bei einem Bederson-Score von null Punkten in diesem Testbereich keine Defizite mehr. Die Kontrollen waren während der sieben Tage nie ohne funktionelles Defizit. Sie hatten am siebten postoperativen Tag 1,2 \pm 0,7 Punkte im Bederson-Score.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich die MMP-9^{-/-} Mäuse hinsichtlich der neurologischen Funktionseinschränkungen, welche durch die genannten Tests gemessen wurden, besser erholten als ihre Kontrollgruppe.

Neuroscore

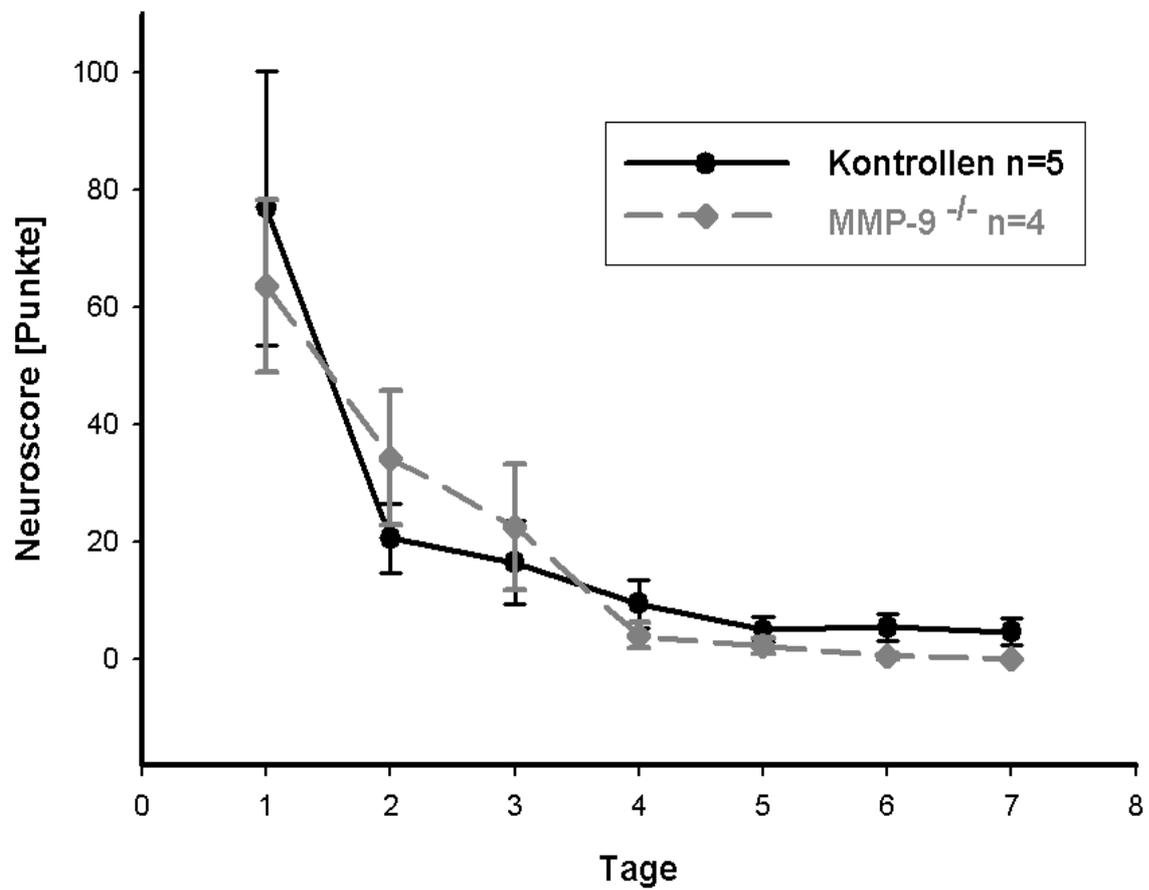


Abbildung 18: Neuroscore und NSS-Score der MMP-9^{-/-} Mäuse und ihrer Kontrollen über 7 Tage

Bederson Score

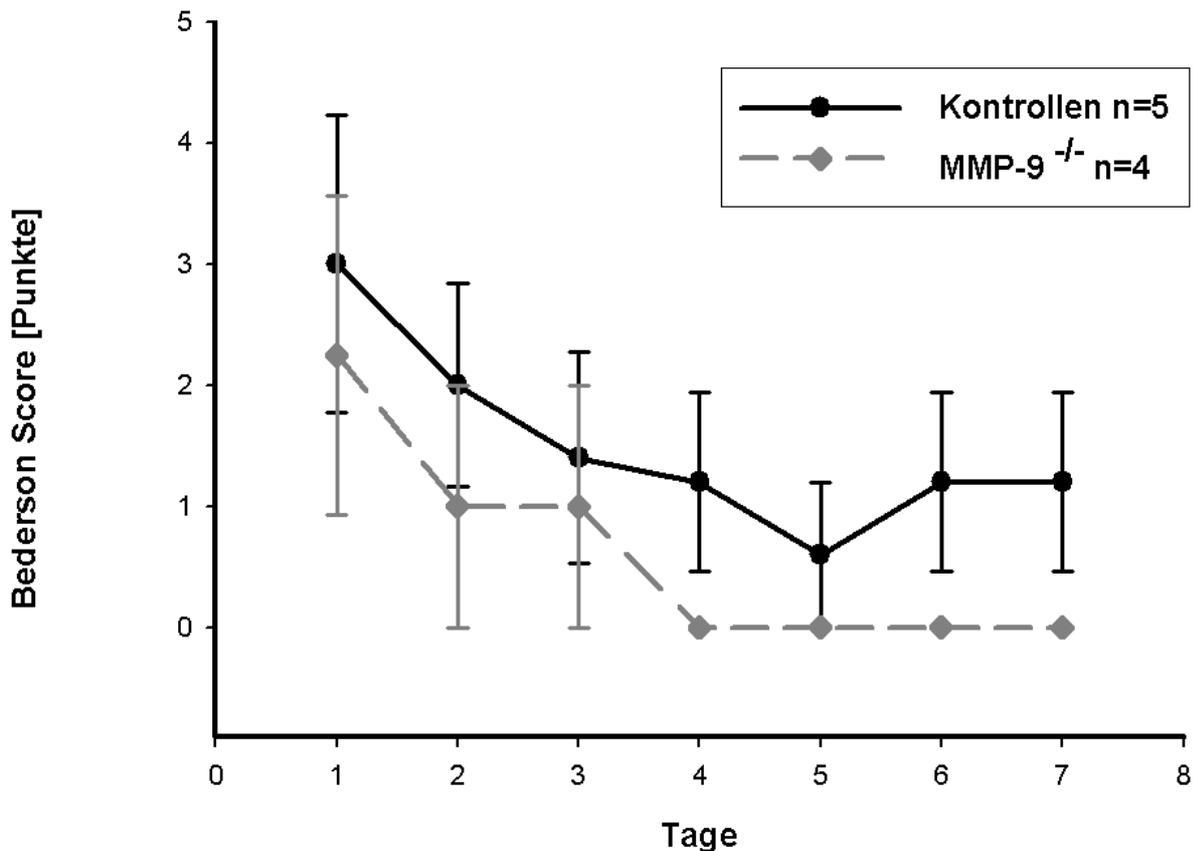


Abbildung 19: Bederson-Score der MMP-9^{-/-} Mäuse und ihrer Kontrollen über 7 Tage

3.4.2.3 Gewichtsverlauf

Nach Induktion der Subarachnoidalblutung wurden die Mäuse sieben Tage lang beobachtet und täglich gewogen. Der Gewichtsverlauf ist von Interesse, weil er ein Indiz für das Allgemeinbefinden der Mäuse darstellt.

Im Folgenden wurde erst der Gewichtsverlauf der Mäuse beschrieben, welche nach der Operation sieben Tage überlebten, im Anschluss wurde auch der Gewichtsverlauf der im Beobachtungszeitraum verendeten Tiere aufgeführt.

Sowohl die FVB/N Kontrolltiere, als auch die MMP-9 Knockout-Mäuse verloren an den ersten beiden Tagen nach der Subarachnoidalblutung am meisten Gewicht. Die Kontrollmäuse wogen am ersten postoperativen Tag $92,97\% \pm 0,01\%$ (MW \pm SEM) ihres Ausgangsgewichtes und nahmen im Verlauf weiter ab. Am zweiten Tag wogen sie $86,06\% \pm 0,01\%$ und am dritten Tag $80,06\% \pm 0,02\%$ ihres Ausgangsgewichtes.

Ab dem vierten Tag fingen die Kontrollen an wieder zuzunehmen und erreichten am siebten Tag nach der Blutung ein Gewicht von $94,1\% \pm 0,1\%$ des präoperativen Gewichtes. Ein ähnlicher Verlauf war auch bei den MMP-9 defizienten Mäusen zu beobachten. Diese hatten am ersten Tag nach OP noch $92,9\% \pm 0,0\%$ ihres präoperativen Gewichtes, auch sie nahmen im Verlauf zunächst weiter ab und hatten noch $84,2\% \pm 0,0\%$ am zweiten und $78,6\% \pm 0,0\%$ ihres präoperativen Gewichtes am dritten Tag nach SAB. Die MMP-9 Knockout-Mäuse fingen ebenfalls am vierten postoperativen Tag an wieder zuzunehmen und erreichten am Ende des Beobachtungszeitraumes $89,4\% \pm 0,1\%$ ihres Ausgangsgewichtes.

Insgesamt verloren die MMP-9^{-/-} Mäuse im Verlauf immer 1-2% mehr an Gewicht als ihre Kontrollen, was am siebten Tag nach SAB mit 4,7% Gewichtsunterschied am deutlichsten wurde.

Von den Mäusen, welche den Beobachtungszeitraum nicht überlebten, bzw. 48 oder 72 Stunden nach Induktion der Subarachnoidalblutung verstarben, hatten die FVB/N Mäuse durchschnittlich noch 92,0% und die MMP-9 Knockout-Mäuse 87,9% ihres präoperativen Gewichtes.

Das präoperative Ausgangsgewicht der FVB/N Mäuse unterschied sich signifikant vom ihrem postoperativen Gewicht an jedem der sieben Tage nach der Blutung ($p < 0,05$), ihr Gewicht am sechsten und siebten Tag unterschied sich signifikant vom Gewicht am dritten, vierten und fünften Tag nach SAB ($p < 0,05$). Ebenso gab es einen statistisch signifikanten Unterschied hinsichtlich des Gewichts der Kontrollen am ersten und zweiten postoperativen Tag im Vergleich zum dritten, vierten und fünften Tag nach der Blutung ($p < 0,05$).

Gleichermaßen unterschied sich das präoperative Ausgangsgewicht der MMP-9^{-/-} Mäuse signifikant von ihrem durchschnittlichen Gewicht an allen anderen Tagen des Beobachtungszeitraumes ($p < 0,05$). An keinem der sieben postoperativen Tage bestand ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den MMP-9^{-/-} Mäusen und ihren Kontrollen.

Gewichtsverlauf prozentual zum Ausgangsgewicht

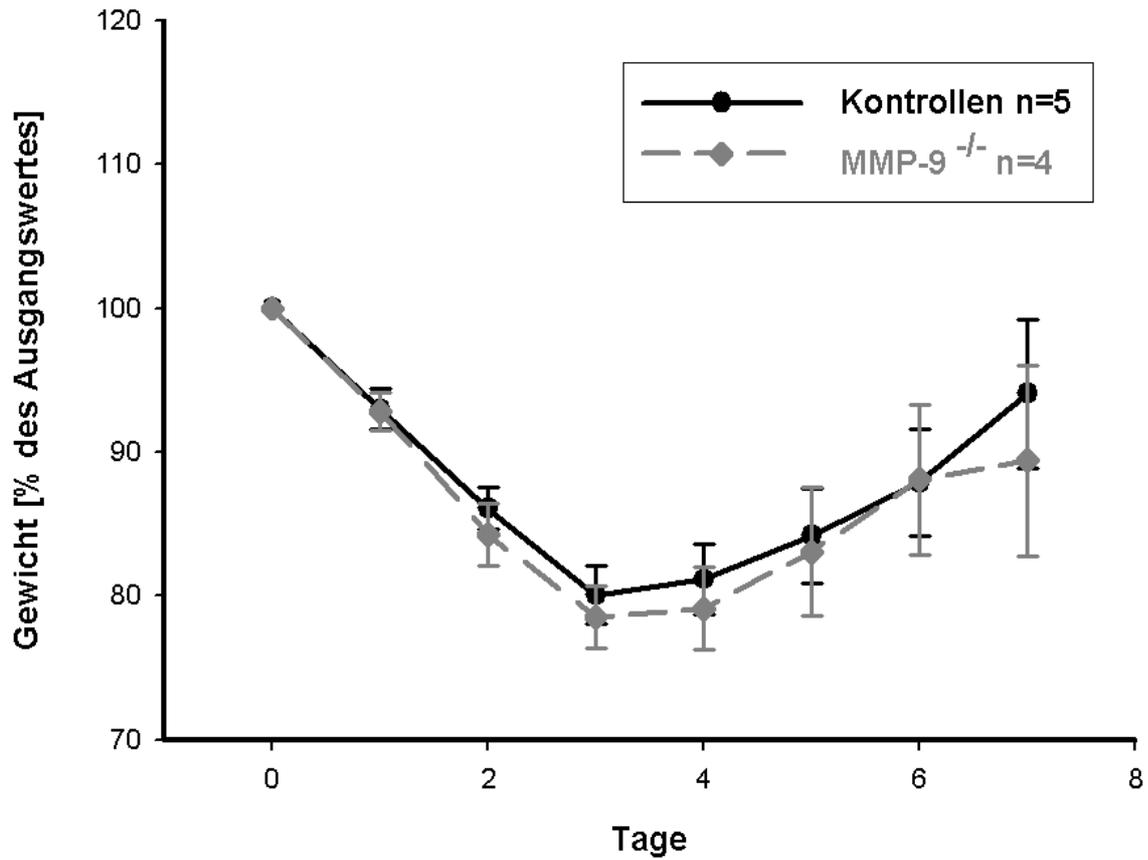


Abbildung 20: Gewichtsverlauf der MMP-9^{-/-} Mäuse und ihrer Kontrollen prozentual zum Ausgangsgewicht

Gewicht prozentual zum Vortag

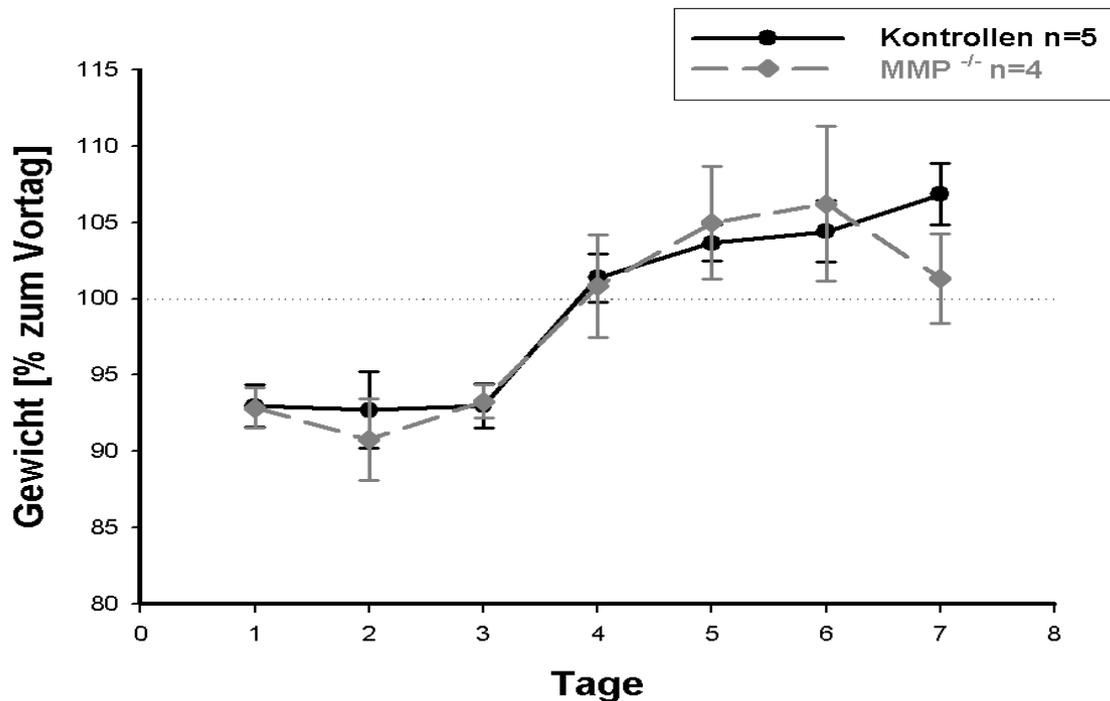


Abbildung 21: Gewichtsverlauf der MMP-9^{-/-} Mäuse und ihrer Kontrollen prozentual zum Vortag

3.4.3 Beobachtungen über 24 Stunden nach Subarachnoidalblutung

Zur Beantwortung der Frage, ob und inwieweit Matrix-Metalloproteinase-9 an der Entstehung eines posthämorrhagischen Hirnödems beteiligt ist, wurde 24 Stunden nach Subarachnoidalblutung gravimetrisch der Hirnwassergehalt bei den MMP-9^{-/-} Mäusen und ihren FVB/N Kontrollen bestimmt. Zuvor wurden Gewicht und neurologische Funktionseinschränkungen dokumentiert.

3.4.3.1 Überleben

Von insgesamt neun MMP-9^{-/-} Mäusen, die die Operation überlebten, verstarb eine Maus innerhalb der ersten 24 Stunden nach Induktion der Subarachnoidalblutung, acht MMP-9^{-/-} Mäuse konnten der Hirnödemmessung zugeführt werden. Dies entspricht einer Mortalität von 11% innerhalb der ersten 24 Stunden nach SAB in der Gruppe der MMP-9 Knockout-Mäuse. Die Mortalität in der Kontrollgruppe lag bei 30%, hier verstarben drei von zehn Mäusen innerhalb 24 Stunden nach Subarachnoidalblutung, sodass bei sieben Mäusen eine gravimetrische Bestimmung des Hirnwassergehaltes vorgenommen wurde. Vor der gravimetrischen Ödemmessung wurden das Gewicht der Mäuse und neurologische Defizite überprüft.

3.4.3.2 Neurologische Funktionen

Die FVB/N Kontrollen hatten am Tag nach der Subarachnoidalblutung durchschnittlich $85 \pm 4,3$ Punkte im Neuroscore und 5 ± 0 Punkte im Bederson-Score, d.h. alle Kontrolltiere hatten ausnahmslos einen maximal schlechten Bederson-Score mit schwersten neurologischen Ausfällen und Bewusstseinsstörungen ohne Vorhandensein von Spontanbewegungen.

Im Vergleich dazu hatten die MMP-9^{-/-} Mäuse mit durchschnittlich $51,3 \pm 11,4$ Punkten im Neuroscore und $2,7 \pm 1,0$ Punkten im Bederson-Score deutlich geringere, durch diese Scores gemessene Defizite. Drei Mäuse hatten mit einem sehr schweren funktionellen Defizit ohne spontane motorische Aktivität einen maximal schlechten Bederson-Score, eine weitere Maus zeigte eine geringfügige Einschränkung der neurologischen Funktionen mit einem eingeschränkten Stellreflex und erhielt dafür einen Punkt und zwei weitere MMP-9^{-/-} Mäuse wiesen einen völlig normalen neurologischen Status auf. Die neurologischen Defizite, welche durch den Neuroscore gemessen wurden unterschieden sich statistisch signifikant zwischen den Gruppen ($p=0,031$).

Neuroscore nach 24 Stunden

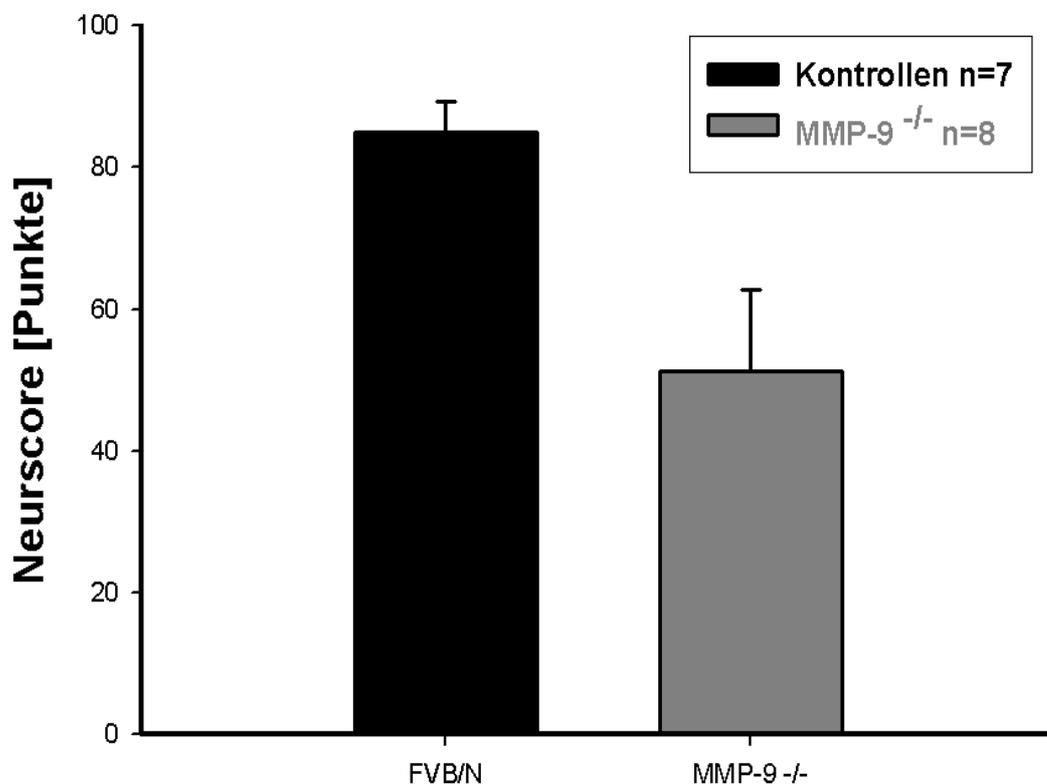


Abbildung 22: Neuroscore der MMP-9^{-/-} Mäuse und ihrer Kontrollen 24 Stunden nach Induktion der SAB

Bederson Score

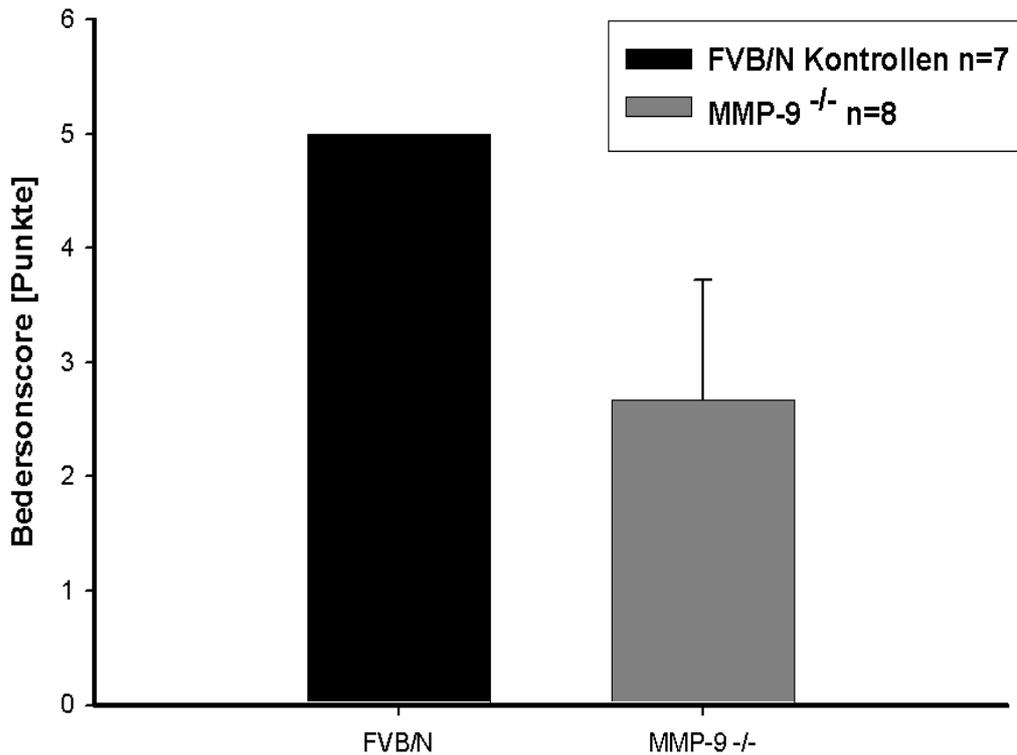


Abbildung 23: Bederson-Score der MMP-9^{-/-} Mäuse und ihrer Kontrollen 24 Stunden nach Induktion der SAB

3.4.3.3 Gewichtsverlauf

24 Stunden nach Auslösen der Subarachnoidalblutung wogen die FVB/N Mäuse durchschnittlich $93,90 \pm 0$ % ihres präoperativen Ausgangsgewichtes (MW \pm SEM) und die MMP-9 Knockout-Mäuse $92,37 \pm 0,01$ % ihres Ausgangsgewichtes. Hinsichtlich des Gewichtes nach 24 Stunden bestand kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen.

3.4.3.4 Bestimmung des ICP 24 Stunden nach Subarachnoidalblutung

Wie unter 2.2.9 beschrieben, erfolgte 24 Stunden nach Induktion der SAB erneut eine ICP Messung über 15 Minuten, dabei zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen den beiden Gruppen ($p < 0,001$). Die MMP-9^{-/-} Mäuse hatten signifikant niedrigere ICP Werte als ihre Kontrollen. Zu Beginn der ICP Aufzeichnung betrug der intrakranielle Druck bei den FVB/N Mäusen $15,7 \pm 3,2$ mmHg (MW \pm SEM), im Laufe der Messung stieg der ICP weiter an und am Ende erreichte er Werte von $23,7 \pm 2,4$ mmHg. Im Vergleich dazu lag der ICP bei den MMP-9^{-/-} Mäusen zu Beginn der Messung bei $12,8 \pm 1,7$ mmHg und erreichte nach 15 Minuten $17,7 \pm 2,2$ mmHg.

ICP nach 24 Stunden

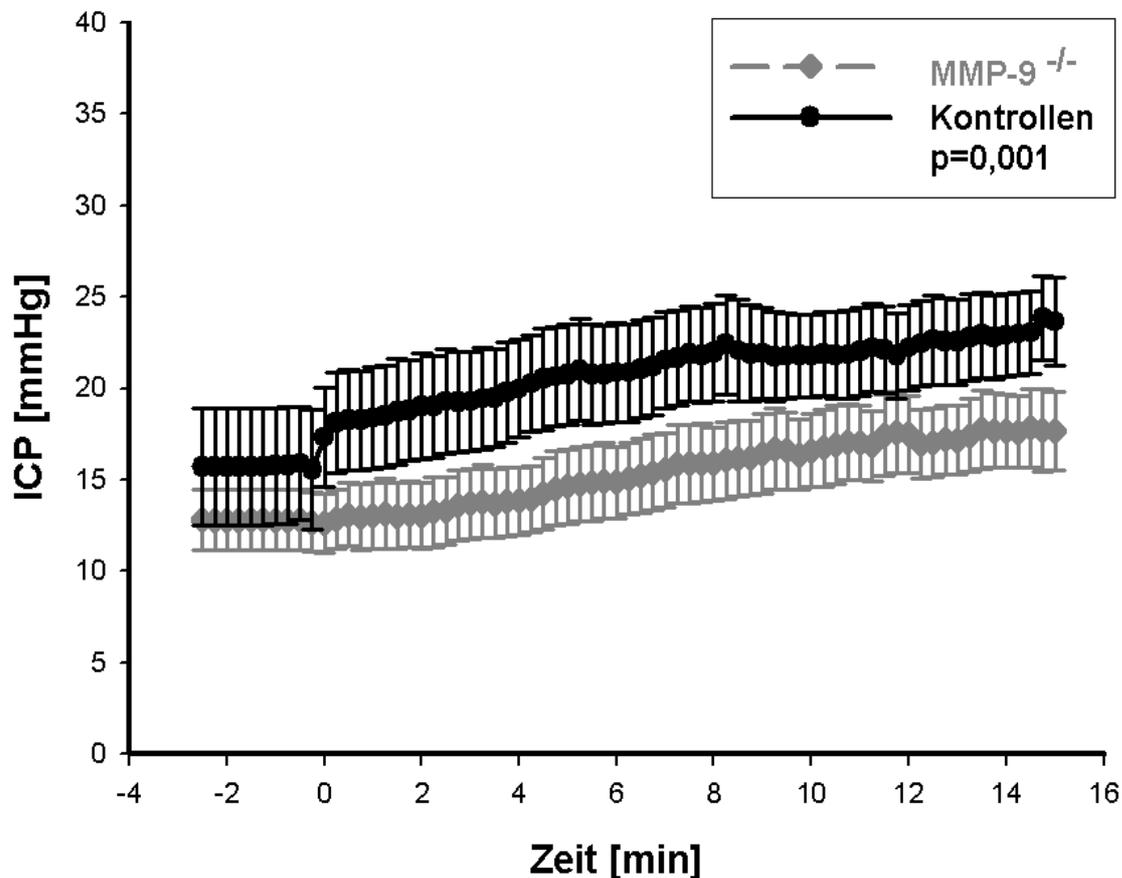


Abbildung 24: ICP-Verlauf der MMP-9^{-/-} Mäuse und ihrer Kontrollen 24 Stunden nach Induktion der SAB

3.4.3.5 Bestimmung des Hirnwassergehaltes 24 Stunden nach Subarachnoidalblutung

Da Matrix-Metalloproteinase-9 die Gefäßpermeabilität erhöhen kann, wurde 24 Stunden nach Induktion der Subarachnoidalblutung eine gravimetrische Hirnödemmessung, wie unter 2.2.10 beschrieben vorgenommen. Beim Hirnödem handelt es sich um eine Zunahme des Hirnvolumens, die vor allem durch eine Zunahme des Hirnwassergehaltes bedingt ist. Die gravimetrische Messung ergab für die ersten 24 Stunden nach Subarachnoidalblutung eine Zunahme des Hirnwassergehaltes. Der Hirnwassergehalt nach 24 Stunden, ausgedrückt in Prozent, unterschied sich in der Kontrollgruppe mit $78,9 \pm 0,5$ % nicht signifikant von der MMP-9^{-/-} Gruppe mit $78,9 \pm 0,5$ %.

4 Diskussion

4.1.1 Früher Hirnschaden nach Subarachnoidalblutung

Es gibt eine ganze Reihe neuerer Veröffentlichungen, die darauf hindeuten, dass die pathophysiologischen Folgen einer aneurysmatischen Subarachnoidalblutung nicht nur zu einem Vasospasmus, sondern auch zu einem globalen ischämischen Hirnschaden führen. Der frühe Hirnschaden wird als Hauptgrund für die hohe Mortalität von SAB-Patienten diskutiert¹⁹. Unter anderem tragen die Erhöhung des intrakraniellen Druckes, die Reduktion der cerebralen Durchblutung, die Suppression des cerebralen Perfusionsdruckes, der Abfall der Sauerstoffversorgung des Gehirns, der Zusammenbruch der Blut-Hirn-Schranke, das cerebrale Ödem und der neuronale Zelltod^{36,38} zur Hirnschädigung bei. Obwohl die einzelnen Faktoren schon bekannt sind, bleiben ihre Aus- und Wechselwirkungen im einzelnen noch unklar. Demzufolge gibt es derzeit noch keine Therapieansätze, die den frühen Hirnschaden verhindern könnten.

Eine herausragende Rolle nimmt das Hirnödeme als bedrohliche Manifestation des Sekundärschadens ein. Die Schädigung der Blut-Hirn-Schranke und das folgende Ödem haben vermutlich entscheidenden Einfluss auf langfristige kognitive Einschränkungen¹²⁴

4.1.2 Zusammenbruch der Blut-Hirn-Schranke und Entstehung eines Hirnödems

Die Charakterisierung des Hirnödems als „Vergrößerung des Gehirns infolge eines vermehrten Wassergehalts“ geht auf Anton (1904) zurück, M. Reichardt nahm 1905 in seinem Beitrag „Zur Entstehung des Hirndrucks“¹⁹⁹ die Differenzierung Hirnödeme und Hirnschwellung vor. Bei der makroskopischen Betrachtung fand er feuchte (Hirnödeme) oder trockene (Hirnschwellung) Schnittflächen des Gewebes vor. Im Weiteren beschrieb Reichardt auch die Blut-Hirn-Schrankenfunktion. Erste systematische Untersuchungen zur Blut-Hirn-Schranke haben vermutlich Paul Ehrlich und E.E. Goldmann durchgeführt, sie fanden heraus, dass das Gehirn, im Gegensatz zu den anderen Organen den Übertritt von Substanzen selektiv kontrolliert. Histo-morphologische Untersuchungen des Hirnödems wurden im deutschsprachigen Raum von Zülch und seinen Mitarbeitern durchgeführt, sie gelangten zu der Auffassung, dass das Hirnödeme gemäß der Virchow'schen Definition eine interstitielle Flüssigkeitsansammlung repräsentiert, die Hirnschwellung hingegen eine Zellvergrößerung des Hirnparenchyms darstellt.

Erst 1967 konnten Reese und Karnowsky mit Hilfe des Elektronenmikroskops klären, welche morphologische Struktur für die Blut-Hirn-Schrankenfunktion verantwortlich ist, sie stellten fest,

dass die Endothelzellen der Gehirnkapillaren in die Blutbahn injizierte Meerrettichperoxidase zurückhielten¹⁹⁵. Mittlerweile ist bekannt, dass nicht nur die Endothelzellen und ihre Verbindung durch tight junctions, sondern auch Perizyten, die Basalmembran und Astrozyten die funktionelle Einheit der Blut-Hirn-Schranke darstellen. Spezifische Transportsysteme stellen dabei die Versorgung des Gehirns sicher.

Der Neuropathologe Igor Klatzo differenzierte im Jahr 1967 zwischen dem vasogenen und dem zytotoxischen Hirnödem^{120,122}.

Klatzo definierte das zytotoxische Hirnödem als Schwellung des Intrazellulärraums mit gleichzeitiger Abnahme des extrazellulären Volumens bei intakter endothelialer Zellstruktur der Blut-Hirn-Schranke. Für die Entstehung des zellulären Ödems werden laut Baethmann et al. drei Mechanismen verantwortlich gemacht¹⁴:

1. Erhöhte Permeabilität der Zellmembran für Natrium mit konsekutivem Na^+ -Einstrom
2. Dysfunktion der, in der glialen, neuronalen und endothelialen Membran lokalisierten, Na^+/K^+ -ATPase
3. Aufhebung des Membranpotentials gefolgt von einem Funktionsverlust der aktiven Ionenpumpen

Folge ist ein gestörtes Gleichgewicht der intra-/extrazellulären Natrium-Konzentration. Die erhöhte intrazelluläre Na^+ -Konzentration bedingt einen erhöhten intrazellulären osmotischen Druck und führt über die gesteigerte Wasserretention zu einer Schwellung der Zellen¹³.

Beim vasogenen Hirnödem führen zunächst eine Gefäßverletzung und cerebrale Ischämie zum Zusammenbruch der Blut-Hirn-Schranke, was wiederum zu einer gesteigerten vaskulären Permeabilität mit Aufweitung der interendothelialen Zell-Zell-Kontaktmoleküle, der tight junctions, führt. Folge ist eine erhöhte Durchlässigkeit für Wasser- und Makromoleküle in das Hirnparenchym¹²³. Proteinreiche Flüssigkeit und Plasmabestandteile, die unter physiologischen Bedingungen die Blut-Hirn-Schranke nicht überwinden können, treten in das Hirnparenchym über. Über die durch die Raumforderung hervorgerufene Hirnschädigung hinaus treten weitere Schädigungen der Blut-Hirn-Schranke durch die Freisetzung von Mediatoren aus Neuronen und Gliazellen auf. Verschiedene Mediatorsysteme, sog. vasoaktive Stoffe, verstärken die Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke und augmentieren das vasogene Hirnödem. Diese vasoaktiven Mediatoren^{214,264,265} sind im Anschluss tabellarisch aufgeführt, sie gehören zu den Genen der Inflammationskaskade, die die endotheliale Permeabilität erhöhen. Darüber hinaus existieren neuere Mediatoren, die nicht zu den vasoaktiven Substanzen gehören, wie Aquaporine, Vascular

Endothelial Growth Factor¹³³ (VEGF) und Matrix-Metalloproteinasen¹⁵⁶, sie führen ebenfalls zu einem Zusammenbruch der Blut-Hirn-Schranke und tragen wesentlich zur Entstehung des vasogenen Hirnödems bei. Im Folgenden wird auf die Mediatoren Bradykinin und Matrix-Metalloproteinase-9 eingegangen.

Tabelle vasoaktiver Substanzen, die eine Erhöhung der Blut-Hirn-Schranken Permeabilität bedingen

Angiotensinogen¹⁰²

Arachidonsäure

Bradykinin¹⁸²

Glutamat¹¹⁵

Interleukine IL-1a, IL-1b, IL-2^{1,262,270}

Leukotriene²⁵

Phospholipase A2¹⁷

Sauerstoff-Radikale (ROS)¹⁵⁷

Serotonin und Histamin²⁶⁴

Stickstoffmonoxid (NO)¹⁶⁹

Tabelle 9: Vasoaktive Substanzen, die eine Erhöhung der Blut-Hirn-Schranken Permeabilität bedingen

4.1.3 Nachweis des Kallikrein-Kinin Systems im ZNS und Bedeutung bei pathophysiologischen Prozessen

Bradykinin als Mediator des vasogenen Hirnödems und weitere Bestandteile des Kallikrein-Kinin Systems, insbesondere auch die Bradykinin Rezeptoren wurden bereits in zahlreichen experimentellen Arbeiten im ZNS nachgewiesen. Das Vorkommen von Gewebe (=t) und Plasma (=p) Kallikrein bzw. deren mRNA konnte in verschiedenen Regionen des Rattengehirns^{41,118,119,220,227,228}, in humanen cerebralen Autopsiegeweben^{39,146,190}, aber auch in Liquor^{116,220} und Gefäßen^{191,211} beider Spezies nachgewiesen werden. Bradykinin wird nach Aktivierung des Kallikrein-Kinin-Systems gebildet^{194,196,255}.

Dass Bradykinin eine Blut-Hirn-Schrankenstörung verursacht, wurde bereits 1984 in der Arbeitsgruppe um Baethmann et al. in einer intravitralen fluoreszenzmikroskopischen Studie gezeigt. Die Superfusion des Kortex mit Bradykinin bedingte bei Katzen eine Permeabilitätserhöhung pialer Gefäße für Natrium Fluorescein²⁵⁵. Ähnliche Beobachtungen wurden

von Raymond et al. gemacht. Die Applikation von Bradykinin in die A. carotis von Ratten führte zu einer starken Extravasation des systemisch verabreichten Enzyms Meerrettichperoxidase, sowie zu einer Anhäufung des Enzyms im Endothel. Von der Arbeitsgruppe um Baethmann et al. konnte auch demonstriert werden, dass eine Hemmung des Enzyms Kallikrein verbunden mit einer Inhibition der Kininsynthese zu einem geringer ausgeprägten Hirnödem nach Schädel-Hirn-Trauma führt. Die Hemmung des Kallikrein erfolgte durch das Enzym Apotinin und Soybean Tripsin Inhibitor. Dass die Kallikreininhibition in gleicher Weise auch bei cerebraler Ischämie ein Hirnödem verringern kann zeigten Kamiya et al^{104,256}.

Mittlerweile ist bekannt, dass Bradykinin die Pathologie zahlreicher Krankheitsbilder entscheidend beeinflusst, so zum Beispiel die der fokalen cerebralen Ischämie^{80,104-106}, der bakteriellen Meningitis¹⁴³, der Epilepsie und die des Schädel-Hirn-Traumas^{181,185,234,251}.

Kasuya et al. fanden am Tag der Subarachnoidalblutung erhöhte Bradykininkonzentrationen im Liquor und im Plasma, die drei Tage nach SAB wieder deutlich abgefallen waren ($122,7 \pm 22,7$ pg/ml im Liquor am Tag der SAB, nach drei Tagen $17,1 \pm 3,0$ pg/ml)¹¹².

Die Aktivierung des Kallikrein-Kinin Systems bei SAB erfolgt wahrscheinlich durch das Gerinnungssystem und den Hageman-Faktor. Trifft der Hageman-Faktor auf negativ geladene Oberflächen wird er voraktiviert, diese Form katalysiert die Umwandlung von Präkallikrein zu Kallikrein. Kallikrein wandelt nun wiederum Kininogen zu Kinin um. Kallikrein und Kinin wandeln den Hageman-Faktor in seine aktivierte Form, den Faktor XIIa um²⁷⁴. Kallikrein ist ein sehr potenter Aktivator des Faktors XII der Blutgerinnung zu Faktor XIIa.

Weitere Aktivierungen des Kallikrein-Kinin Systems finden durch eine Blut-Hirn-Schrankenstörung und durch einen verminderten pH bei Ischämie statt.

4.1.4 Rolle von Bradykinin und seiner Rezeptoren für die Pathologie nach SAB

Durch zahlreiche Untersuchungen mit Bradykinin-Rezeptor-Antagonisten und Bradykinin-Rezeptor Knockout-Mäusen wurde deutlich, dass die Pathophysiologie des cerebralen Ödems über den Kinin-B2 Rezeptor vermittelt wird.

Während der B2 Rezeptor konstitutiv exprimiert ist, wird der B1 Rezeptor erst durch inflammatorische, chemische oder mechanische Prozesse stimuliert und führt zur Aggravierung der Inflammation. Es ist bekannt, dass eine B1 Rezeptor Aktivierung eine Leukozytenaktivierung auslöst. Der Kinin B1 Rezeptor wurde bisher nahezu ausschließlich auf der Zellmembran nachgewiesen^{81,252}, wohingegen eine Kinin B2 Rezeptor Expression auf Neuronen^{80,189}, cerebralem

Gefäßendothel, Astrozyten und Mikroglia nachgewiesen werden^{43,163,191} konnte. Welche Rolle der Rezeptor für die Neuronen spielt ist jedoch noch nicht abschließend geklärt, von Parpura et al. wurde vermutet, der B2 Rezeptor habe eine wichtige Rolle hinsichtlich der Signalübertragung zwischen Neuronen und Astrozyten¹⁷⁵. Der Nachweis des Rezeptors auf cerebralem Gefäßendothel deckt sich dagegen mit der Vorstellung seiner Funktion für die Entstehung eines Hirnödems.

Zahlreiche Untersuchungen bestätigen, dass die alleinige Hemmung des B2 Rezeptors durch einen selektiven B2 Rezeptor Antagonisten eine deutliche Reduktion des Hirnschadens zur Folge hat. Beispielsweise durch ein verringertes Infarktvolumen und Hirnödem bei fokaler cerebraler Ischämie, oder durch ein vermindertes Läsionsvolumen, eine geringer ausgeprägte Blut-Hirn-Schrankenstörung und ein geringeres cerebrales Ödem in Schädel-Hirn-Trauma Modellen. Im Zusammenhang mit Rückenmarkstraumen und Pneumokokkenmeningitis konnten ebenfalls ähnliche Ergebnisse publiziert werden^{53,77,90,107,108,143,170,181,185,200,234,286}.

Eine gleichzeitige Hemmung von B1 und B2 Rezeptoren durch einen B1/B2-Rezeptor-Antagonisten führte in Versuchen zur globalen cerebralen Ischämie in Gerbils dagegen zu keiner Reduktion des Hirnschadens¹³¹.

Die Ergebnisse der Versuchsreihen von Relton et al. zur fokalen cerebralen Ischämie sprechen ebenfalls für neuroprotektive Effekte einer B2 Rezeptor Blockade. Durch eine Blockade des B2 Rezeptors im Rahmen einer cerebralen fokalen Kälteläsion konnte eine signifikante Reduktion der, durch die Kälteläsion entstandenen, Hirnschädigung bei Ratten und eine geringer ausgeprägte Hirnschwellung bei Mäusen erreicht werden⁷⁸. Die zusätzliche Blockade des B1 Rezeptors erbrachte keine weitere Reduktion des Hirnschadens und die alleinige Blockade des B1 Rezeptors hatte keinen Effekt auf das vasogene Hirnödem nach der Kälteläsion¹⁸¹. Gröger et al.⁸² publizierten ähnliche Ergebnisse bei der fokalen cerebralen Ischämie bei der Maus.

Eine B2 Rezeptor Aktivierung im ZNS führt über spezies- und lokalisationsabhängige, verschiedene Mechanismen zur Vasodilatation und erhöhter Blut-Hirn-Schranken Permeabilität²⁶⁶. Diese Veränderungen nach B2 Rezeptor Aktivierung werden unter anderem durch die Freisetzung von Prostaglandinen und Leukotrienen, NO und reaktiven Sauerstoffmolekülen verursacht^{33,166,171}.

4.1.5 Nachweis von MMP-9 im ZNS und Bedeutung bei pathophysiologischen Prozessen

Neben Bradykinin und anderen vasoaktiven Substanzen konnte auch Matrix-Metalloproteinase-9 als Mediator des vasogenen Hirnödems identifiziert werden.

Pathologisch erhöhte MMP-9 Konzentrationen konnten in einer ganzen Reihe cerebraler

Pathologien nachgewiesen werden: anhaltend erhöhte MMP-9 Konzentrationen im Liquor wurden bei inflammatorischen Prozessen im ZNS, wie tuberkulöser Meningitis¹²⁹, bei HIV assoziierten Erkrankungen des ZNS¹³⁸, bei Multipler Sklerose und bei bakterieller Meningitis festgestellt^{132,134,136,135,136,261}, wobei der Ursprung, der im Liquor vorkommenden Matrix-Metalloproteinasen umstritten ist. Grundsätzlich werden sie von Leukozyten, einschließlich neutrophiler Granulozyten und Lymphozyten produziert, die während Entzündungsprozessen ins Gehirn einwandern. Darüber hinaus wurde eine endogene Produktion von Matrix-Metalloproteinasen bei Patienten mit Multipler Sklerose festgestellt¹³⁹.

Aber auch beim Schädel-Hirn-Trauma, bei Rückenmarksverletzungen und bei intracerebralen Blutungen^{2,5,203} lassen sich erhöhte MMP-9 Konzentrationen im Liquor nachweisen^{94,162}. Im Rahmen der cerebralen Ischämie wurden ebenfalls erhöhte MMP-9 Konzentrationen im Gehirn und im Blut von Patienten festgestellt, verbunden mit einem deutlich erhöhten Risiko für eine Einblutung ins Infarktareal.

Schon mehrfach wurde postuliert, dass Matrix-Metalloproteinasen einen erheblichen Einfluss auf das neuronale Geschehen nach einer Hirnschädigung haben. Sowohl beim ischämischen Schlaganfall, als auch beim Schädel-Hirn-Trauma und nach intracerebralen Blutungen wurde demonstriert, dass Matrix-Metalloproteinasen in Form von Blut-Hirn-Schrankenstörungen und Hirnödemen wesentlich zum sekundären Hirnschaden beitragen.

Für den Abbau des Kollagen IV nach cerebraler Ischämie wird das Matrix-Metalloproteinase-System verantwortlich gemacht²⁰⁹. Heo et al. beschrieben erstmals den Zusammenhang von MMP-9 und haemorrhagischer Transformation nach cerebraler Ischämie⁹¹.

Rosenberg et al. fanden heraus, dass die MMP-9 Konzentration während der transienten fokalen cerebralen Ischämie deutlich erhöht ist. Nach Verwendung monoklonaler Antikörper gegen MMP-9 und bei MMP-9 defizienten Mäusen waren geringer ausgeprägte Blut-Hirn-Schrankenstörungen, weniger Hirnödem und ein geringeres Infarktvolume festzustellen⁸.

Eine Schädel-Hirn-Trauma Studie an Ratten bestätigte, dass MMP-9 an der Entstehung von Blut-Hirn-Schrankenstörungen und cerebralem Ödem beteiligt ist, indem beides durch einen MMP-9-Inhibitor abgeschwächt werden konnte²²⁶. In einer anderen Untersuchung konnte demonstriert werden, dass MMP-9^{-/-} Mäuse nach Schädel-Hirn-Trauma ein deutlich geringeres motorisches Defizit aufwiesen²⁶⁷.

Im Rahmen einer Subarachnoidalblutung kommt es zu einer sekundären Schädigung des Gehirns durch globale Ischämie und zytotoxische neuroinflammatorische Kaskaden. Entzündungsreaktionen

führen zu einer Erhöhung von Matrix-Metalloproteinasen, die wiederum eine erhöhte Durchlässigkeit der Blut-Hirn-Schranke bedingen, da die Proteolyse der extrazellulären Matrix zu vasogenem Hirnödem, Blutung und Zelltod durch die Schädigung der Basalmembran der Blutgefäße und die Zerstörung der tight junctions zwischen Endothelzellen führt¹⁴¹.

4.1.6 Blut-Hirn Schrankenstörung und Ausbildung eines Hirnödems nach SAB

Eine signifikante Permeabilitätserhöhung der Blut-Hirn-Schranke nach SAB wurde sowohl beim Menschen, als auch in zahlreichen experimentellen Studien nachgewiesen. Sie korreliert mit der Entwicklung einer verzögerten cerebralen Ischämie und letztlich schlechtem klinischem Outcome. Eine Blut-Hirn-Schrankenstörung entwickelt sich bereits in einem sehr frühen Stadium nach einer Subarachnoidalblutung. Dieses Phänomen ist primär unabhängig vom intrakraniellen Druckanstieg, vom Anschwellen des Gehirns, vom Hirnödem oder von der reduzierten cerebralen Durchblutung, wobei alle diese Faktoren sekundär auch eine Störung der Blut-Hirn-Schranke bedingen können^{55,69,72,96,98,160,178,212,230}. Obwohl die Mechanismen, die nach einer Blutung zu einer Entwicklung eines Hirnödems führen noch nicht hinreichend verstanden sind, wurde das Hirnödem als unabhängiger Risikofaktor für eine erhöhte Mortalität und ein schlechtes Outcome nach Subarachnoidalblutung identifiziert⁴⁴. Auch der zeitliche Verlauf des cerebralen Ödems nach SAB wurde mehrfach beschrieben. Schöller et al. zeigten, dass bereits sechs Stunden nach einer Subarachnoidalblutung eine Funktionsstörung mit einer Permeabilitätserhöhung der Blut-Hirn-Schranke vorhanden ist, die mit einem maximal erhöhten Hirnwassergehalt der ipsilateralen Hemisphäre 48 Stunden nach experimentell induzierter SAB in der Ratte einhergeht²¹⁶. Die Arbeitsgruppe um Germano et al.⁷⁰ kamen zu ähnlichen Ergebnissen bezüglich des zeitlichen Verlaufes der Blut-Hirn-Schrankenstörung nach SAB. Das Maximum der Blut-Hirn-Schranken Permeabilität des ipsilateralen Kortex war in deren Untersuchungen ebenfalls 48 Stunden nach SAB erreicht, wobei die Ausgangssituation 72 Stunden nach der Blutung wieder hergestellt war. Dies impliziert, dass die Dysfunktion der Blut-Hirn-Schranke einen sich selbst reparierenden Prozess darstellt. Schöller et al. fanden eine signifikante Korrelation zwischen der Schädigung der Basalmembran und der Permeabilitätserhöhung der Blut-Hirn-Schranke und bestätigten die Annahme, dass ein enger Zusammenhang zwischen einem posthämorrhagischen Hirnödem und der Schädigung der Basalmembran besteht.

Thal et al. haben bereits mehrfach nachgewiesen, dass der Hirnwassergehalt 24 und 48 Stunden nach Subarachnoidalblutung signifikant erhöht ist. Das Maximum der neurologischen Defizite nach SAB findet zeitgleich mit dem maximal erhöhten Hirnwassergehalt 24 Stunden nach der Blutung

statt^{245,247}. Deshalb wurden die Gehirne für die Bestimmung des cerebralen Ödems in diesen Versuchen 24 Stunden nach SAB entnommen.

4.2 Diskussion der Methoden

4.2.1 Verwendung eines Tiermodells

Da die Möglichkeiten die Pathophysiologie der SAB am Menschen zu erforschen sehr limitiert sind und klinische Studien hinsichtlich der großen Varianz, was die Lokalisation und Schwere der Blutung betrifft, schlecht standardisierbar sind, ist ein gutes Tiermodell die Voraussetzung für ein besseres Verständnis der SAB¹⁸⁷.

Aus ethischen Gründen ist es unmöglich beim Menschen ein derartiges neuronales Trauma auszulösen um anschließende Beobachtungen hinsichtlich Überleben, pathophysiologischer Prozesse und neuronaler Schädigung anzustellen. Deshalb entstammt ein überwiegender Anteil der Erkenntnisse über ischämische Insulte im Gehirn Tiermodellen.

Klare Vorteile eines Tiermodells sind die gute Standardisierbarkeit und hohe Reproduzierbarkeit, sowie die Möglichkeit verschiedene Variablen kontrolliert zu beeinflussen. Hinzu kommen optimale Bedingungen und Voraussetzungen für histopathologische und biochemische Gewebsanalysen.

4.2.2 Auswahl der Versuchstiere

Für die Auswahl eines SAB Modells an der Maus sprachen eine Reihe von Gründen: durch Inzucht konnte eine große genetische Homogenität bei ausgeprägter Homologie bezüglich Physiologie, Pathophysiologie und Genetik zu höheren Säugetieren und zum Menschen erreicht werden. Hinzu kommen Gründe wie kostengünstige Aufzucht und Haltung¹⁸⁶. Trotz geringem Körpergewicht und kleiner Größe stellt die Operation von Mäusen dank ausgereifter mikrochirurgischer Techniken und Vorrichtungen kein großes Problem dar.

Ein entscheidender Vorteil für die vorliegende Versuchsanordnung ist das vollständig entschlüsselte Genom der Maus und die daraus resultierende Möglichkeit, Tiere heranzuzüchten, die Deletionen bestimmter Gene aufweisen, sog. Gen Knockout Stämme.

Die für diese Arbeit verwendeten Kinin B1 und B2 Rezeptor Knockout-Mäuse waren nach Deletion des entsprechenden Gens nicht mehr in der Lage den Kinin B1 respektive B2 Rezeptor zu exprimieren. Gleiches gilt für den zweiten verwendeten Knockout Stamm der Matrix-Metalloproteinase-9 defizienten Mäuse, welche nicht mehr imstande waren MMP-9 zu exprimieren.

Durch die Eliminierung dieser spezifischen Gene bot sich die Möglichkeit, die Rolle und

Bedeutung des Proteins, für das dieses Gen kodiert, hinsichtlich Physiologie und Pathophysiologie zu analysieren.

Lange Zeit wurden Rezeptor Antagonisten verwendet um die Bedeutung des Kinin B2 Rezeptors hinsichtlich neuronaler Schädigungen zu untersuchen, dies hatte jedoch entscheidende Nachteile verglichen mit dem vollständigen Fehlen des Rezeptors, wie es nach Deletion der Fall ist. Insbesondere die unzureichende Erfahrung hinsichtlich der Pharmakokinetik und -dynamik des Antagonisten für die jeweils untersuchte Tierart schränkten die Aussagekraft der Ergebnisse grundsätzlich ein.

Hergestellt werden Gen Knockout-Mäuse durch die Ausschaltung des entsprechenden Gens in einer embryonalen Stammzelle. Im Fall der Kinin B2 und B1 Rezeptor Knockout-Mäuse waren es embryonale Stammzellen des Mäusestammes SV129 in denen das Gen ausgeknockt wurde und welche dann in die Blastozyste des Mäusestammes C57/Bl6 injiziert wurden. C57/Bl6 Mäuse stellen den genetischen Hintergrund für Kinin B2 und B1 Rezeptor Knockout-Mäuse dar^{27,28,57}. In zahlreichen Versuchen unserer Arbeitsgruppe wurde gezeigt, dass es sich bei C57/Bl6 Mäusen daher um valide Kontrollen für die Kinin Rezeptor Knockout-Mäuse handelt.

Genauso verhält es sich mit den MMP-9^{-/-} Mäusen und ihren Kontrollen, ein Vektor wurde benutzt um das Exon 2 des MMP-9 Gens teilweise, und das Intron 2 des Gens vollständig zu zerstören. Das Konstrukt wurde dann in 129S ZW4 Stammzellen eingebracht. Korrekt veränderte Stammzellen wiederum wurden in C57Bl/6J Blastozysten injiziert. Die daraus entstandenen Männchen wurden mit Black Swiss Weibchen und deren Nachkommen wiederum über mehrere Generationen mit Black Swiss Mäusen gepaart, bevor sie mit FVB/N Tieren gepaart wurden, die letztendlich als Kontrolltiere für die MMP-9^{-/-} Mäuse verwendet wurden.

4.2.3 Anästhesie

Viele der in der Veterinärmedizin und für Tierversuche angewendeten Narkoseformen weisen neuroprotektive Wirkungen auf, weshalb diese Narkotika für die Erforschung neuronaler Pathologien nicht in Frage kommen.

Inhalationsnarkotika wie Halothan oder Isofluran stellen grundsätzlich wegen ihrer kurzen Halbwertszeit eine gut steuerbare Narkoseform dar, sie haben aber zusätzlich zur in diesem Fall unerwünschten neuroprotektiven Wirkung weitere Nachteile weshalb sie für die hier durchgeführten Versuche nicht geeignet waren. Inhalationsnarkotika bedingen eine verminderte Sekretion von endogenen Katecholaminen und setzten den cerebralen Metabolismus und den ATP Verbrauch herab⁹². Darüber hinaus ist ein starker Einfluss auf die cerebrale Vasoreaktivität bekannt, nach

Inhalation von Halothan kommt es zur Außerkraftsetzung der cerebralen Autoregulation. Außerdem wurde in Langzeitversuchen eine Reduktion der cerebralen Durchblutung um 50% nachgewiesen^{31,229}.

Ebenso schieden Narkoseformen mit Ketamin aus, weil sie sich schlecht steuern lassen und lange Nachschlafzeiten mit dem damit einhergehenden Risiko einer Hypoglykämie und Hypothermie produzieren. Die beste Narkoseform für die Versuche mit dem Ziel die neuronalen Pathologien im Rahmen der SAB zu erforschen schien daher die Kombination von Midazolam, Medetomidin und Fentanyl. Medetomidin, ein α_2 Adrenorezeptor Agonist mit einer geringen analgetischen Wirkung wurde für die Sedierung verwendet. Die analgetischen Eigenschaften eines α_2 Agonisten alleine sind jedoch für die Durchführung einer Operation nicht ausreichend, deshalb wurde Fentanyl dazugegeben, ein kurz wirksamer μ Opioid Rezeptor Agonist, der stark analgetisch wirksam ist. Für die Durchführung der Anästhesie wurde noch das Benzodiazepin Midazolam hinzugenommen. Mit dieser Kombination wurde eine tiefe Narkose induziert, die sich hervorragend für operative Eingriffe, wie sie im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurden, eignet²⁴⁴. Über diese Medikamentenkombination zur Narkosedurchführung sind bis dato keine neuroprotektiven Einflüsse bekannt. Um die sedative Komponente des Medetomidin am Ende der Narkose zu antagonisieren wurde der spezifische α_2 Blocker Atipamezol²⁵⁹ eingesetzt. Die Wirkung von Fentanyl wurde mit Naloxon antagonisiert. Naloxon kann die Wirksamkeit von Opioiden sehr effizient aufheben. Der einzige Nachteil besteht darin, dass Naloxon eine deutlich kürzere Halbwertszeit als Fentanyl selbst besitzt, dadurch besteht die Möglichkeit eines Fentanyl-Überhanges mit respiratorischer Insuffizienz. Dem wurde durch eine genaue, gewichtsadaptierte Applikation der beschriebenen Medikamentenkombination entgegengewirkt, sodass zum Ende der Operation nur noch eine geringe Menge des Fentanyl antagonisiert werden musste. Die Benzodiazepin Effekte wurden kompetitiv von dem Rezeptor Antagonisten Flumazenil geblockt²⁴⁴.

Da die Mäuse während der Narkose ihre Körpertemperatur nicht selbstständig aufrecht erhalten konnten, wurde, um eine Hypothermie zu vermeiden ihre Körpertemperatur über die gesamte OP Dauer mittels einer Heizmatte und einer rektalen Temperatursonde konstant bei ca. 37 °C gehalten. Anschließend wurden die Tiere nach OP Ende in einen auf 32 °C geheizten Inkubator gegeben. Dadurch konnte auch nach der Operation eine Hypothermie während der Nachschlafzeit vermieden werden, denn Hypothermie hat nachgewiesenermaßen einen starken neuroprotektiven Effekt bei cerebraler Ischämie^{34,35,45,52,110,217,250}. Sie beeinflusst z.B. die Ausbildung eines Hirnödems im Sinne eines geringeren Ödems. Ursächlich hierfür sollen Veränderungen der cerebralen Durchblutung, des Energiemetabolismus sowie eine verminderte Sekretion von Neurotransmittern sein.

4.2.4 Modell zur Induktion der Subarachnoidalblutung

Grundsätzlich sollte ein Tiermodell zur Untersuchung der Subarachnoidalblutung einige Kriterien¹⁸⁶ erfüllen, damit die pathologischen und pathophysiologischen Prozesse nach stattgehabter Subarachnoidalblutung sinnvoll untersucht werden können.

Das Modell sollte

- dem Menschen entsprechende Blutungsverhältnisse und Blutverteilungsmuster, wie sie z.B. nach Aneurysmaruptur eines cerebralen Gefäßes vorliegen, auslösen
- eine gute Standardisierbarkeit und hohe Reproduzierbarkeit der Blutung gewährleisten
- die pathophysiologischen und morphologischen Früh- und Spätfolgen zuverlässig abbilden

1979 wurde erstmals ein Tiermodell zur Induktion einer Subarachnoidalblutung in der Ratte von Barry et al. beschrieben¹⁶, wobei die SAB durch Punktion der Arteria basilaris ausgelöst wurde. In den letzten 30 Jahren wurden zahlreiche weitere Methoden und Modelle an vielen verschiedenen Spezies zur Induktion einer Subarachnoidalblutung entwickelt. Die meisten Modelle verwenden eine der folgenden drei Techniken, um experimentell eine SAB auszulösen^{151,186}:

1. Punktion einer intrakraniellen Arterie (A. basilaris^{4,16,101} oder A. carotis interna^{19,258}) mit Blutung in die unmittelbare Umgebung
2. Präparation und Darstellung einer Arterie und deren Exposition zu autologem Blut, welches an einer anderen Stelle entnommen wurde^{109,151}
3. Injektion von autologem Blut in den Subarachnoidalraum, entweder als einmalige Injektion in die Cisterna magna^{50,126,149,192,231}, oder in die Cisterna chiasmatica¹⁸⁰, oder als Doppelinjektion von autologem Blut in die Cisternen magna^{150,238,257}

Die vorwiegend zur Untersuchung eines posthämorrhagischen Vasospasmus verwendeten Injektionsmodelle bieten vor allem den Vorteil, dass die Blutungsmenge und die Lokalisation der Blutung gut reproduzierbar sind^{186,273}. Jedoch entspricht das Modell auf Grund der fehlenden Gefäßläsion, wie sie bei der Ruptur eines Aneurysmas auftritt, nicht der Pathophysiologie der SAB beim Menschen. Einer der wesentlichen Unterschiede stellt die Beobachtung dar, dass sich die cerebrale Durchblutung nach Injektion des Blutes binnen 15 Minuten wieder erholt, im Gegensatz, zu den in vivo Messungen in SAB Patienten. Möglicherweise ist deswegen auch die Mortalität in diesen Modellen deutlich geringer.

Für die Fragestellung, ob und inwieweit MMP-9 und Bradykinin zum sekundären Hirnschaden nach Subarachnoidalblutung in Folge einer Gefäßläsion beitragen, wurde eine in unserer Arbeitsgruppe

entwickelte, modifizierte Variante des intraluminalen Fadenmodells nach Bederson¹⁹ gewählt. Nahezu zeitgleich mit Bederson publizierte Veelken²⁵⁸ ein ähnliches Modell zur Induktion einer Subarachnoidalblutung. Beiden gemeinsam ist die Punktion einer intrakraniellen Arterie. Dieses Modell ermöglicht es Blutungen auszulösen, wie sie im Rahmen einer Aneurysmaruptur bei Menschen auftreten. Weitere Analogien zur SAB beim Menschen sind die ähnliche Mortalität von 30-50%^{19,218} sowie der initial rasche Anstieg des intrakraniellen Druckes und der simultane Abfall der cerebralen Durchblutung. Aus diesen Gründen ist das modifizierte Bederson-Modell am ehesten in der Lage die wesentlichen, im Zusammenhang mit einer SAB auftretenden Pathologien adäquat abzubilden. Aber auch das intraluminale Fadenmodell birgt potentielle Fehlerquellen, dahingehend, dass ein zu langes Verweilen beim Vorschieben des Fadens in die A. carotis interna möglicherweise eine Ischämie hervorruft. Zusätzlich birgt die Okklusion der A. carotis interna mittels Aneurysmaclip die Gefahr einer Ischämie im Medialstromgebiet. Allerdings vergingen vom Zeitpunkt der Einführung des Fadens in die A. carotis externa bis hin zur Perforation maximal fünf Minuten, was eine Ischämie mit neurologischen Auswirkungen nahezu unmöglich macht. Ein Nachteil des Fadenmodells ist, dass die Intensität und das Ausmaß der Blutung durch die ausgetretene Blutmenge schwerer kontrollier- oder standardisierbar sind. Vorversuche mit dem Ziel, die Mäuse sehr zügig ohne Komplikationen zu operieren und ähnlich große Subarachnoidalblutungen auszulösen ermöglichten, eine akzeptable Standardisierung neben guter Reproduzierbarkeit zu erreichen, hinzu kommt, dass die Subarachnoidalblutung beim Menschen interindividuell ebenfalls unterschiedliche Ausmaße annimmt. Insgesamt spiegelt das modifizierte intraluminale Fadenmodell die Pathophysiologie einer Aneurysmaruptur eines cerebralen Gefäßes bei gut vergleichbarer Mortalität, guter Standardisierung und Reproduktion am besten wider.

4.2.5 Intrakranielle Druckmessung

Bei der unter 2.2.3.3 beschriebenen Methode der intrakraniellen Druckmessung wird, anders als beim Menschen die epidurale Platzierung der Sonde gewählt um keinen intraparenchymatösen Schaden zu verursachen, welcher nachfolgende Analysen und Auswertungen hinsichtlich neuronaler Zellschäden beeinträchtigen könnte. Außerdem stellte diese Methode eine gut reproduzierbare und relativ einfach durchzuführende Art der ICP Messung dar. Die ICP Messung war essentiell für diese Art der SAB Induktion, denn der explosionsartige intrakranielle Druckanstieg zusammen mit dem Sistieren der intracerebralen Durchblutung demonstrierte das erfolgreiche Auslösen einer Subarachnoidalblutung. Die Hauptursachen für den plötzlichen Anstieg des ICP im Rahmen einer SAB sind das plötzliche Vorhandensein von Blut im Subarachnoidalraum, welches einen Widerstand in der Liquorzirkulation bedingt, die raumfordernde Wirkung des Hämatoms und eine

akute Vasoparalyse. Dieser rasante ICP Anstieg und der Abfall der cerebralen Perfusion spielen eine entscheidende Rolle in der Entwicklung eines Hirnödems. Persistierende ICP Erhöhungen sind mit schlechter klinischer Prognose nach Aneurysmaruptur verbunden. Im klinischen Alltag ist die kontinuierliche ICP Messung eine entscheidende Methode um pathophysiologische Veränderungen nach SAB zu detektieren und eine wichtige Grundlage für therapeutische Entscheidungen^{51,100,144,260}.

4.2.6 Laser-Doppler Fluxmetrie

Die Laser-Doppler Fluxmetrie (LDF) ist eine Methode, die eine unmittelbare, kontinuierliche und nicht-invasive Messung der fokalen cerebralen Mikrozirkulation erlaubt⁶². Die Bestimmung der Flussgeschwindigkeit basiert auf dem Doppler-Effekt, d.h. es wird die Frequenzänderung von Laserlicht der Wellenlänge 820 nm durch vorüberziehende Erythrozyten ermittelt. Der Laser-Doppler Fluss errechnet sich aus dem Produkt der Erythrozytenkonzentration im entsprechenden Gewebeareal und der Fließgeschwindigkeit der Erythrozyten⁶². Im Gegensatz zu anderen Messtechniken wie Autoradiographie, radioaktiven Tracern oder Clearance Methoden, welche absolute Werte ermitteln, berechnet die Laser-Doppler Fluxmetrie relative Änderungen der cerebralen Durchblutung in einem Gewebevolumen von 1 mm³ ^{54,67}. Allerdings wurde eine gute Korrelation von prozentual ausgedrückten LDF Werten mit den prozentualen Änderungen, die durch andere Techniken bestimmt wurden belegt^{54,59,88}. Daraus ergibt sich, dass die LDF keine genauen absoluten Messungen, sehr wohl aber genaue Messungen von Veränderungen im regionalen Blutfluss, wie sie im Rahmen einer cerebralen Ischämie auftreten, zulässt⁵⁴.

In verschiedenen Studien wurde der direkte Zusammenhang zwischen der relativen Änderung des Doppler-Signals und Perfusionsänderungen belegt. Dadurch hat diese Methode in vielen experimentellen und klinischen Bereichen Anwendung gefunden. Die Stärken der Laser-Doppler Fluxmetrie liegen in der hohen räumlichen und zeitlichen (1Hz) Auflösung, sowie in der kontinuierlichen und unverzögerten Aufzeichnung der cerebralen Perfusion. Aus diesen Gründen ist die LDF essentieller Bestandteil des Versuchsaufbaus zur Induktion der Subarachnoidalblutung. Die Laser-Doppler Sonde wurde über einem repräsentativen Abschnitt des Mediastromgebietes positioniert, so wurde die rasche Beurteilung der lokalen cerebralen Durchblutung ermöglicht und das Auslösen der SAB durch den Durchblutungsabfall zeitgleich mit dem ICP Anstieg verifiziert.

4.2.7 Erhebung des neurologischen Status

Die tägliche neurologische Untersuchung und der neurologische Status im Verlauf sind entscheidende Parameter zur klinischen Beurteilung der Therapie und der funktionellen Erholung von Patienten nach einer Subarachnoidalblutung, umso mehr, wenn man bedenkt, dass ca. 50% der

SAB Patienten versterben und viele derjenigen, die überleben neurologische Funktionsstörungen und neurologisch bedingte Verhaltensänderungen beibehalten⁹⁹. Analog zur klinisch neurologischen Untersuchung wurde täglich der neurologische Status der Tiere bestimmt.

Eine Reihe klinischer und experimenteller Studien haben gezeigt, dass es eine enge Beziehung zwischen der Schwere der Blutung, dem Ausmaß des ischämischen Schadens und dem klinischen Status der Patienten gibt^{15,111,140,153}.

Der hier verwendete allgemeine Neuroscore ist ursprünglich dem von Katz et al.¹¹³ entwickelten Score nachempfunden. Dieser war zur neurologischen Beurteilung von Ratten entwickelt worden, die im Rahmen eines Herzstillstandes eine globale cerebrale Ischämie erlitten, wie sie auch bei der SAB eine Rolle spielt. Der von Katz et al. entwickelte Test bestand aus folgenden Komponenten: Bewusstseinslage, Atmung, Hirnnervenfunktionen, motorische Funktionen, sensorische Funktionen und Koordination. Dieser Test bildete eine zuverlässige Kriterienauswahl für die neurologische Bewertung der Tiere nach SAB, da er sowohl vegetative, als auch höhere kognitive Funktionen miteinbezieht und Kraft, Koordination und Hirnnervenfunktionen untersucht, was die Beurteilung globaler cerebraler Funktionen und Fähigkeiten erlaubt²². Für die Anwendung dieses Scores sprachen weiterhin die einfache Erhebung, die klare Differenzierung der Kriterien, sodass die Möglichkeiten der unbewussten Manipulation durch den Untersucher minimiert wurden.

Zusätzlich kam ein weiterer, ebenfalls einfach durchzuführender neurologischer Test zur Anwendung, welcher ursprünglich von Bederson et al. entwickelt wurde, nun aber in einer modifizierten Variante zum Einsatz kam, um mit insgesamt sechs Punkten postischämische motorische Defizite und Verhaltensauffälligkeiten zu bewerten. Der ursprüngliche Score wurde um den Punkt „keine Spontanbewegung“ als Ausdruck einer stark verminderten Vigilanz und um „Kreisbewegungen nur bei Zug am Schwanz“ für eingeschränkte Lateralisation erweitert^{142,152,216,243}.

Darüberhinaus wurde die Fähigkeit der Maus über einen Balken einer bestimmten Breite zu balancieren getestet, dabei wurden motorische und vestibuläre Funktionen überprüft. Meistens sind Defizite in Form von Fehlritten oder Stürzen vom Balken nur während der ersten zwei Tage nach SAB festzustellen^{71,72,96}.

4.2.8 Gravimetrische Ödembestimmung

Die gravimetrische Bestimmung des cerebralen Ödems erfolgte 24 Stunden nach Induktion der Subarachnoidalblutung. Studien haben gezeigt, dass die Entstehung eines cerebralen Ödems bereits wenige Stunden nach SAB beginnt und nach 24 Stunden maximal ausgeprägt ist²⁴⁷.

Nach Entnahme wurden die Gehirne gewogen und für 24 Stunden bei 110° getrocknet, danach wurde das Trockengewicht bestimmt, da nach 24 Stunden ist eine Gewichtskonstanz erreicht ist²³³.

Diese Art der Ödembestimmung hat sich als effizient, schnell und kostengünstig ausgezeichnet.

4.2.9 Histologie

In Autopsiestudien am Menschen, aber auch in Experimenten am Tiermodell wurde demonstriert, dass Neurone im Gehirn unterschiedlich empfindlich auf Ischämie reagieren, was u.a. durch ihre Lokalisation bedingt ist. An Ratten wurde gezeigt, dass die Neurone des Hippocampus, vor allem die der CA1 Region besonders sensibel für eine Schädigung durch Ischämie sind^{10,113}.

Das bei diesen Versuchen angewandte endovaskuläre Fadenmodell zur Induktion einer SAB führt durch den drastischen ICP Anstieg, zur Reduktion der cerebralen Perfusion und zu einer globalen Ischämie, die auch die Regionen CA 1-3 und den Gyrus dentate des Hippocampus betrifft¹⁷³ und zu einem neuronalen Zellschaden führt.

Untersuchungen deuteten darauf hin, dass nach SAB eine neuronale Schädigung mit einem Untergang von Nervenzellen in den Hippocampusregionen CA 1-3 frühestens nach 72 Stunden nachgewiesen werden kann²⁴⁶. Aus diesem Grund wurden die Gehirne der Mäuse für diese Untersuchungen erst am siebten Tag nach Induktion der Subarachnoidalblutung entnommen und für die histologische Aufarbeitung vorbereitet.

Es ist noch nicht viel über den Zeitverlauf des neuronalen Zellschadens nach SAB bekannt. Aber auch das Fehlen des neuronalen Zelltodes sagt noch nichts über die Funktionalität der Neurone aus. Die Bedeutung von ischämischen Neuronen ist schwierig zu erfassen, solange man nicht den Bezug zu neurologischen Defiziten herstellen kann. Studien zum Thema Schlaganfall haben dargelegt, dass die Behandlung einer Ischämie, z.B. durch Hypothermie, zwar dem neuronalen Zelltod entgegenwirkt, aber das funktionelle Outcome nicht verbessert^{46,269}. Deshalb ist es wichtig, die neurologische Untersuchung, die Bewusstseinslage und Verhaltensänderungen in Zusammenschau mit histologischen Parametern zu betrachten, um die Komplexität der Hirnschädigung nach SAB zu erfassen^{26,243}.

4.2.10 Zeitliche Verläufe der MMP-9 Aktivierung nach unterschiedlichen ZNS Pathologien

Bei Rückenmarksverletzungen und spinalem Trauma gibt es bereits Aussagen zum zeitlichen Verlauf von MMP-9 Konzentrationen¹⁶². Es kommt zu einem schnellen MMP-9 Anstieg nach einem spinalen Trauma oder einer Rückenmarkskontusion. Die gesteigerte MMP-9 Aktivität 24 Stunden

nach Trauma findet zeitgleich mit der Blut-Rückenmarks-Schrankenstörung statt. Nach 72 Stunden sind die MMP-9 Konzentrationen beim spinalen Trauma wieder deutlich reduziert und nach sieben Tagen ist keine Konzentrationserhöhung mehr nachzuweisen. MMP-9 wurde 24 Stunden nach dem spinalen Trauma in Gliazellen, Makrophagen, neutrophilen Granulozyten und vaskulären Bestandteilen nachgewiesen. MMP-9 defiziente Mäuse wiesen deutlich seltener eine Schädigung der Blut-Rückenmarks-Schranke auf, sie hatten eine geringere Infiltration mit neutrophilen Granulozyten und zeigten eine signifikant bessere Erholung der motorischen Funktionen im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen.

Am Beispiel der Subarachnoidalblutung haben sich Sehba et al. und Guo et al. mit der zeitlichen Expression und Aktivierung von MMP-9 nach SAB befasst. Sehba et al.²²³ untersuchten die Schädigung der Basalmembran indem sie den Abbau von Kollagen Typ IV und die MMP-9 Expression im zeitlichen Verlauf nach SAB beobachteten. Es zeigte sich eine frühe Reduktion des Kollagen Typ IV und ein Anstieg der MMP-9 Expression drei Stunden nach SAB, ein Maximum war nach sechs Stunden zu beobachten, nach 48-72 Stunden waren die Ausgangswerte wieder erreicht²²³. Diese Untersuchungen demonstrieren, dass bereits sehr früh nach einer Subarachnoidalblutung eine Funktionsstörung der Basalmembran eintritt. Guo et al.⁸⁶ publizierten ähnliche Ergebnisse und beschrieben eine erhöhte MMP-9 Aktivität 12 bis 72 Stunden nach einer Subarachnoidalblutung, mit einem Maximum nach 24 Stunden. Außerdem postulierte die Arbeitsgruppe einen Untergang von Laminin, der 12 Stunden nach SAB vorhanden ist und ein Minimum nach 24 Stunden erreicht hat.

Diese Erkenntnisse sind kongruent mit den Beobachtungen zum zeitlichen Verlauf der Blut-Hirn-Schrankenstörungen und der Entwicklung eines cerebralen Ödems nach einer Subarachnoidalblutung. Daraus kann gefolgert werden, dass MMP-9 durch die Schädigung der Basalmembran zur Entstehung des Hirnödems nach SAB beiträgt.

4.3 Diskussion der Ergebnisse

4.3.1 Intrakranieller Druck

Der Anstieg des intrakraniellen Druckes (ICP) während einer Subarachnoidalblutung steht in direktem Zusammenhang mit dem ausgetretenen Blutvolumen, dem Grad der Obstruktion der Liquorzirkulation, diffuser Vasoparalyse und der Dilatation distaler cerebraler Arteriolen²²⁴.

Der ICP war im Rahmen der durchgeführten Versuche vor dem Auslösen der Subarachnoidalblutung konstant bei ca. 5-7 mmHg, mit der Gefäßperforation stieg er

explosionsartig an, ein Charakteristikum für die Induktion einer SAB. Analog steigt beim Menschen der ICP wenn Blut aus einem rupturierten Aneurysma in die subarachnoidalen Zisternen fließt und den Liquor verdrängt²²⁴. Im Anschluss an die Blutung wurde der ICP für weitere 15 Minuten gemessen, hierzu ist zu erwähnen, dass sich die Werte zwar binnen Minuten wieder erholten, ihr Ausgangsniveau jedoch nicht mehr erreichten. Auch das entspricht den Beobachtungen die nach einer SAB beim Menschen gemacht wurden⁸³. Innerhalb der Versuchsgruppen bestand zu keinem Zeitpunkt ein signifikanter Unterschied hinsichtlich der ICP Werte und der ICP Verläufe. Dies spricht für ein zuverlässiges Modell und ein reproduzierbares Auslösen gleicher Blutungen, sowie für gleiche Ausgangsbedingungen der Tiere in den jeweiligen Gruppen.

4.3.2 Letalität

Die Mortalität beim Menschen nach SAB beträgt 30-70%^{3,18,224}. Es gibt verschiedene Gründe für die hohe Mortalität, im Wesentlichen sind es das Ausmaß der initialen Blutung³⁰ mit der irreversiblen Hirnschädigung in den ersten Minuten nach der Blutung⁸³, eine Rezidivblutung, Vasospasmen mit konsekutiver cerebraler Ischämie und ein Hydrocephalus.

In der Gruppe der B1^{-/-} Mäuse war die Mortalität mit 100% maximal und deutlich höher als in den beiden anderen Gruppen. Die C57/Bl6 Mäuse besaßen eine Mortalität von 73%, während die B2^{-/-} Mäuse mit 50% die niedrigste Mortalität aufwiesen.

Auffallend ist, dass keine der B2^{-/-} Mäuse innerhalb der ersten 24 Stunden verstarb, dies ist sehr erstaunlich, denn die Mortalität ist normalerweise in den ersten 24 Stunden nach SAB am höchsten. Die initiale Blutung, Nachblutungen und das bereits eingesetzte Hirnödem sind unter anderem die Ursache für die erhöhte Mortalität in diesem Zeitraum^{216,245}.

Innerhalb von 48 Stunden post SAB verstarben nur 16% der B2^{-/-} Mäuse, aber 36% der B1^{-/-} Mäuse. Dies unterstützt die Aussagen, dass das cerebrale Ödem in erster Linie über den Kinin-B2 Rezeptor vermittelt wird und die Deletion des Kinin-B1 Rezeptors keine protektive Wirkung hat^{131,200,286}.

In allen Gruppen war der 5. Tag nach SAB kritisch. Insgesamt verstarben 36% der B1^{-/-} und 33% der B2^{-/-} Mäuse am 5. Tag nach SAB. Typisch für diesen Zeitraum ist das Auftreten von Vasospasmen, welche zwischen dem 4. und dem 14. Tag nach einer Subarachnoidalblutung auftreten können und zu sekundären Ischämien führen^{3,18}. In verschiedenen Studien wurde postuliert, dass 40-70% der Patienten einen, durch eine Angiographie oder durch eine transkraniale Dopplersonographie, nachgewiesenen Vasospasmus in den ersten zwei Wochen nach einer Subarachnoidalblutung erleiden. 20-30% von diesen Patienten entwickeln klinische Symptome. Klinisch präsentiert sich ein Vasospasmus mit einer verzögert auftretenden neurologischen

Verschlechterung, die u.a. mit einer Vigilanzminderung einhergeht. Ein symptomatischer Vasospasmus beginnt typischerweise um den 4-5. Tag nach SAB.

Interessanterweise verstarben MMP-9^{-/-} Mäuse innerhalb der ersten 72 Stunden post SAB danach nicht mehr, auch nicht am 5. Tag nach der Blutung.

Die Mortalitätsraten der MMP-9^{-/-} und ihrer Kontrolltiere lagen sehr eng zusammen, im Beobachtungszeitraum von sieben Tagen post SAB verstarben drei von sieben MMP-9^{-/-} Mäusen und zwei von sieben FVB/N Mäusen. Ein Grund für das Fehlen signifikanter Unterschiede könnte die Fallzahl sein.

Sekundäre Ischämie aufgrund der deutlich schlechteren cerebralen Durchblutung könnte u.a. zur höheren Mortalität der MMP-9^{-/-} Mäuse innerhalb der ersten 72 Stunden beigetragen haben. Im Vergleich zur Kontrollgruppe erholte sich die lokale cerebrale Perfusion der MMP-9^{-/-} Mäuse langsamer und schlechter. Die MMP-9 Knockout-Mäuse hatten auch 15 Minuten nach SAB noch eine signifikant geringere lokale cerebrale Perfusion, sie hatten, wenn auch nicht signifikant, höhere Spitzen-ICP-Werte mit durchschnittlich 128 mmHg. Im Vergleich dazu hatten die Kontrolltiere maximal intrakranielle Durckanstiege auf 111 mmHg. In der Literatur wird beschrieben, dass sich die cerebrale Durchblutung in Abhängigkeit der Schwere der Blutung und des ICP Anstieges erholen kann oder auch nicht¹⁹. In Tierversuchen ging eine Reduktion der cerebralen Durchblutung mit einer Konstriktion der großen Blutgefäßen einher²²². Autopsien von Gehirnen, kurz nach einer Subarachnoidalblutung verstorbener Patienten, wiesen einen erheblichen ischämischen Schaden nach, obwohl die genauen Gründe dieser ischämischen Schädigung nicht bekannt sind, wurde die immens eingeschränkte cerebrale Perfusion im Rahmen einer SAB dafür verantwortlich gemacht^{61,165,164}.

Als weitere Ursachen für die Mortalität in den ersten drei Tagen nach einer Subarachnoidalblutung kommen ein akuter Hydrocephalus und eine Nachblutung in Frage. Nachblutungen sind aufgrund der frühen Versorgung und Ausschaltung von Aneurysmen beim Menschen immer seltener der Fall.

Betrachtet man die Mortalität in den Versuchen über 24 Stunden zeigt sich, dass nur 11% der MMP-9^{-/-} Mäuse in den ersten 24 Stunden nach SAB verstarben, in der Kontrollgruppe sind es 30%. Analog zu den B2^{-/-} Mäusen hatten die MMP-9 Knockout-Mäuse in dieser frühen Phase nach SAB, die von Nachblutung und Hirnödem bestimmt wird einen Vorteil.

4.3.3 Neurologische Funktionen

Neben der hohen Mortalität spielt die funktionelle Beeinträchtigung und Behinderung nach einer

Subarachnoidalblutung eine große Rolle. Um neurologische Defizite und die funktionelle Schädigung des Gehirns durch die Subarachnoidalblutung zu detektieren, wurde täglich der neurologische Status der Mäuse erhoben.

Es zeigte sich, dass die Bradykinin-2 Rezeptor Knockout-Mäuse im Vergleich zu ihren Wildtyp-Kontrollen und den B1^{-/-} Mäusen nicht nur die geringste Mortalität, sondern auch das beste funktionelle Outcome nach SAB hatten.

Wichtig ist zu erwähnen, dass die Mäuse unter physiologischen Bedingungen eine unbeeinträchtigte sensomotorische und allgemein neurologische Funktion haben²¹⁰.

Gehirne von Nagetieren weisen ein enormes funktionelles Regenerationsvermögen auf, deshalb lassen sich funktionelle Unterschiede durch neurologische Tests vor allem in den ersten Tagen nach der Blutung detektieren, danach werden die neurologischen Defizite und die Unterschiede zwischen den Tieren immer geringer²⁸⁶. Dies bestätigte sich in diesen Untersuchungen und schlug sich am deutlichsten in den Ergebnissen des Bederson Tests nieder. Das Maximum der neurologischen Beeinträchtigung fiel in allen Gruppen auf den ersten Tag nach Subarachnoidalblutung.

Schon zu diesem Zeitpunkt, zu dem normalerweise das cerebrale Ödem und neurologische Defizite am ausgeprägtesten sind, waren es die B2^{-/-} Mäuse, die mit Abstand am wenigsten funktionell beeinträchtigt waren. Ab dem zweiten Tag nach der Blutung begannen die Mäuse sich unterschiedlich schnell zu erholen. Bemerkenswert ist, dass die B2^{-/-} Mäuse, bei Blutungen gleichen Ausmaßes, von allen Gruppen insgesamt das geringste neurologische Defizit präsentierten und sich am schnellsten wieder erholten, sie verbesserten sich bereits vom zweiten auf den dritten postoperativen Tag deutlich.

Die Kontrolltiere erholten sich erst vom vierten auf den fünften Tag nach SAB, dies war der Zeitpunkt zu dem bereits 45% der Tiere verstorben waren.

Dagegen waren es die B1^{-/-} Mäuse, die durchgehend sowohl im Neuroscore, als auch im Bederson-Score von allen Gruppen die größten neurologischen Defizite aufwiesen und sich am schlechtesten von der Blutung erholten.

Die Beobachtungen hinsichtlich Mortalität und neurologischem Outcome waren in der Hinsicht kongruent, als dass die B2^{-/-} Mäuse im Rahmen der SAB die geringste und die B1^{-/-} Mäuse die größte Beeinträchtigung erfuhren.

In den ersten 24 Stunden nach Induktion der Subarachnoidalblutung hatten die MMP-9^{-/-} Mäuse bessere Neuro- und Bederson-Score Werte und geringere neurologische Defizite als ihre Kontrollen,

obwohl auch sie am ersten Tag nach SAB im Vergleich zu den folgenden Tagen signifikant am meisten beeinträchtigt waren. Die FVB/N Kontrollen wiesen durchweg schwerste neurologische Ausfälle und ausgeprägte Bewusstseinsstörungen auf.

In zahlreichen Untersuchungen hat sich bestätigt, dass eine Blut-Hirn-Schrankenstörung nach Subarachnoidalblutung sehr früh eintritt und dass das cerebrale Ödem binnen 24 Stunden maximal ausgeprägt ist. Gemäß den Untersuchungen von Sehba et al. und Guo et al. ist die Expression von MMP-9 bereits binnen weniger Stunden nach SAB erhöht und hat nach sechs bzw. 24 Stunden ihr Maximum erreicht^{86,223}. MMP-9 führt schon nach wenigen Stunden zum Abbau der Basalmembran und zu einer Störung der Blut-Hirn-Schranke. MMP-9^{-/-} Mäuse hatten genau in dieser Zeit, in der die maximale Beeinträchtigung durch die Blutung und das maximal ausgeprägte cerebrale Ödem vorlag, genau wie die B2 Knockout-Mäuse, im Vergleich zu den Wildtyp Mäusen einen deutlichen Vorteil, was die Mortalität, neurologische Defizite und den intrakraniellen Druck 24 Stunden nach der Blutung betraf.

Es gab innerhalb der Gruppe der MMP-9^{-/-} Mäuse eine signifikante Verbesserung der neurologischen Funktionen vom dritten auf den vierten postoperativen Tag, sowohl im Neuroscore, als auch im NSS und Bederson-Score zeigte sich in diesem Zeitraum eine deutliche Verbesserung des Zustandes. Außerdem starben MMP-9 defiziente Mäuse nach 72 Stunden nicht mehr. Ob diese Beobachtungen ein Hinweis sein könnten, dass MMP-9 nicht nur hinsichtlich eines cerebralen Ödems, sondern auch beim cerebralen Vasospasmus eine Rolle spielt, erfordert weitere Untersuchungen.

Schon von Beginn der postoperativen Phase an hatten die MMP-9 Knockout-Mäuse ein geringeres Defizit im Bederson-Score und ab dem vierten Tag keinerlei durch diesen Score detektierbare Defizite mehr. Diese Beobachtungen betrafen die Mäuse, die bis zum siebten Tag nach Subarachnoidalblutung überlebten. Für die Tiere, die innerhalb der sieben Tage nach SAB verstarben galt, dass die MMP-9^{-/-} Mäuse vor ihrem Tod geringere Defizite in den neurologischen Tests hatten als ihre Kontrollen.

4.3.4 Gewicht

Der Gewichtsverlauf der Mäuse nach SAB ist ein entscheidender Parameter für ihren Allgemeinzustand.

Der schlechte Zustand, in dem sich die Tiere in den ersten Tagen nach SAB befanden, spiegelte sich in ihrem deutlichen Gewichtsverlust wider. Dabei war der Allgemeinzustand der Mäuse zu eingeschränkt, als dass sie Nahrung zu sich hätten nehmen können, was in Anbetracht der hohen

Stoffwechselrate der Tiere zu drastischen Gewichtsabnahmen führte und in einem Circulus vitiosus endete. Es schien ein kritisches Mindestgewicht zu existieren, denn Tiere, die weniger als 80% ihres präoperativen Ausgangsgewichtes erreichten, verstarben.

Post SAB nahmen B1^{-/-} Mäuse im Durchschnitt stetig an Gewicht ab, die B2^{-/-} Mäuse nahmen dagegen ab dem dritten Tag nach SAB regelmäßig zu, ausgenommen die Mäuse, die am fünften Tag nach der Blutung verstarben. Die C57/Bl6 Kontrollen nahmen erst ab dem 5. postoperativen Tag wieder Gewicht zu, sie wogen am dritten und vierten Tag nach Subarachnoidalblutung statistisch signifikant weniger als die B2^{-/-} Mäuse.

Mäuse, die in der Kontrollgruppe verstarben wogen 80% ihres präoperativen Ausgangsgewichtes oder weniger.

Insgesamt wogen die Mäuse am ersten Tag nach OP durchschnittlich 89% ihres Ausgangsgewichtes, jedoch nie weniger als 85%, unabhängig davon, ob eine Maus vorzeitig verstarb oder sieben Tage überlebte. Jedoch starben alle Mäuse deren Initialgewicht unter 20 Gramm lag.

Der Gewichtsverlauf als entscheidender Parameter für den Allgemeinzustand der Tiere schien das widerzuspiegeln, was sich auch schon im Neuroscore abgezeichnet hat, dass die Tiere in den ersten Tagen nach der Blutung am stärksten beeinträchtigt waren und sich danach unterschiedlich schnell erholten. Diese Beobachtung wurde gestützt durch den statistisch signifikanten Unterschied des präoperativen Gewichtes der Kontrollgruppe zum Gewicht am ersten, zweiten und dritten postoperativen Tag und den statistisch signifikanten Unterschied des Gewichtes vom ersten zum zweiten postoperativen Tag. Bei den B2^{-/-} Mäusen unterschied sich ebenfalls das präoperative Gewicht signifikant vom Gewicht am ersten, zweiten, dritten und vierten Tag nach SAB. Außerdem unterschied sich das Gewicht vom ersten zum zweiten und vom zweiten zum dritten Tag.

Andererseits spiegelte der Gewichtsverlauf ebenso wie der Neuroscore wider, dass sich die B2^{-/-} Mäuse insgesamt besser und schneller von der Subarachnoidalblutung erholten bzw. weniger durch die Blutung beeinträchtigt wurden. Sie fingen bereits ab dem dritten Tag nach der Blutung wieder an Gewicht zuzunehmen, die C57/Bl6 Wildtyp-Mäuse dagegen nahmen erst ab dem fünften Tag wieder zu. Dies lässt sich sogar in der Gruppe der Tiere bestätigen, welche den genannten Beobachtungszeitraum nicht überlebten. Auch hier wogen die B2 defizienten Mäuse am Todestag deutlich mehr als die B1^{-/-}- und die C57/Bl6 Mäuse.

Hinsichtlich ihres postoperativen Gewichtsverlaufes unterschieden sich MMP-9^{-/-} und ihre Kontrollen nicht wesentlich voneinander.

4.3.5 Der intrakranielle Druck 24 Stunden nach SAB Induktion

24 Stunden nach dem Auslösen der Subarachnoidalblutung wurde erneut eine ICP Messung durchgeführt, es ließ sich, wie zu erwarten, ein immer noch deutlich erhöhter ICP dokumentieren. Der intrakranielle Druck hatte das Ausgangsniveau vor Induktion der Blutung nicht wieder erreicht. Als mögliche Ursachen dafür kommen das entstandene Hirnödem, die Raumforderung durch das Hämatom oder die Entwicklung eines akuten Hydrocephalus in Frage²²⁴.

In dieser frühen Phase nach einer SAB tritt eher ein Hydrocephalus occlusivus durch Blut, das den Liquorabfluss aus dem Ventrikel behindert auf, in der späten Phase kommt es häufig zum Auftreten eines Hydrocephalus malresorptivus durch eine verzögerte Liquorresorption bei Funktionsstörung der Granulationes arachnoideae.

Nach SAB entwickeln ca. 20-30% der Patienten einen akuten Hydrocephalus innerhalb der ersten drei Tage, meistens liegen größere Blutungen und eine reduzierte cerebrale Perfusion zugrunde. Der Mechanismus für die Entstehung eines akuten Hydrocephalus beinhaltet die Obstruktion der Liquorzirkulation, Blut im Ventrikelsystem, diffuse Verteilung des subarachnoidalen Blutes und Nachblutung^{9,155}.

Die B2^{-/-} und die MMP-9^{-/-} Mäuse hatten 24 Stunden nach SAB Induktion signifikant geringere intrakranielle Drücke als ihre Vergleichsgruppen. Obwohl ein Wert nach 24 Stunden ausreichend wäre, um den ICP nach 24 Stunden zu dokumentieren wurde der intrakranielle Druck erneut über 15 Minuten aufgezeichnet. Über diesen Zeitraum stieg der ICP an. Wahrscheinlich stellte die erneut platzierte ICP Sonde eine zusätzliche Raumforderung in dem ohnehin schon angeschwollenen Gehirn dar.

4.3.6 Das cerebrale Ödem 24 Stunden nach SAB

Wie bereits erwähnt erfüllt Bradykinin alle von Wahl und Schilling formulierten Kriterien als Mediator eines Hirnödems²¹⁴. Es ist mehrfach durch Untersuchungen bestätigt worden, dass Bradykinin die Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke steigert^{194,255}, einen vasodilatatorischen Effekt besitzt^{266,272,278}, unter pathologischen Bedingungen erhöht ist und in der Lage ist, ein vasogenes Hirnödem zu erzeugen. Das fünfte Kriterium besagt, dass die Hemmung zu einer Verminderung des Hirnödems führen muss. Aus diesem Grund wurde in den Knockout-Mäusen und ihren Kontrollen der Hirnwassergehalt 24 Stunden nach Induktion der Subarachnoidalblutung untersucht. Wir entschieden uns, den Hirnwassergehalt nach 24 Stunden zu untersuchen, da unsere Arbeitsgruppe in einer früheren Untersuchung herausfand, dass ein signifikanter Anstieg des Hirnwassergehaltes 24 Stunden nach der Blutung mit dem Maximum neurologischer Defizite einhergeht²⁴⁶. Die

Erwartungen, dass die B2^{-/-} Mäuse die geringste Zunahme des Hirnwassergehaltes vorzuweisen haben werden, da ein vasogenes Hirnödem in erster Linie über den B2 Rezeptor vermittelt wird, konnten in den Untersuchungen bestätigt werden.

Bei den MMP-9^{-/-} Mäusen und ihren Kontrollen ergaben sich keine signifikanten Unterschiede bezüglich des Ödems nach 24 Stunden.

4.3.7 Zellschaden/Morphometrie

Während einer globalen Ischämie, wie sie auch durch den ICP-Anstieg bei einer SAB der Fall ist, sind Neurone in der CA1 und CA2 Region des Hippocampus sehr vulnerabel und gehen nach 3 bis 7 Tagen an Apoptose zugrunde^{237,253}. Schon bald nach einer Subarachnoidalblutung werden verschiedene Arten des Zelltodes aktiviert. Von Nekrose, Apoptose und Autophagie sind nicht nur Neurone und Gliazellen, sondern auch Zellen des cerebralen Gefäßsystems betroffen. Es ist bisher noch nicht geklärt, wie lange diese verschiedenen zum Zelltod führenden Mechanismen nach SAB aktiv bleiben. In Autopsiestudien konnte gezeigt werden, dass die Apoptose von Neuronen während der ersten sieben Tage nach SAB gesteigert ist. Der frühe Zelltod nach Subarachnoidalblutung führt zum Hirnödem, zur Zerstörung der Blut-Hirn-Schranke und zu neurologischen Defiziten^{36,37,174,224}.

4.3.8 Einfluss von MMP-9 auf den Untergang der Neurone im Hippocampus

Der selektive neuronale Zelltod im Hippocampus ist ein charakteristisches Zeichen transienter globaler cerebraler Ischämie. Es wurden bereits viele, potentiell dafür verantwortliche Mechanismen beschrieben. Einige Ursachen für den neuronalen Zelltod liegen sicherlich intrazellulär und haben mit Apoptosekaskaden zu tun. In den Untersuchungen von Lee et al. und Zalewska et al. wird darauf aufmerksam gemacht, dass möglicherweise auch extrazelluläre Pathologien eine entscheidende Rolle dabei spielen könnten^{283,284}. Lee et al. fanden heraus, dass MMP-9 im Hippocampus nach transienter globaler cerebraler Ischämie hochreguliert wird und für den frühen Zelltod der hippocampalen Neurone nach globaler cerebraler Ischämie mit verantwortlich ist¹³⁰. Durch Gelatin-Gel-Zymographie konnten aktive Formen des MMP-9 Proteins im Hippocampus nach transienter globaler Ischämie nachgewiesen werden¹⁷².

Die Unterdrückung der MMP-9 Aktivität durch einen geeigneten Inhibitor konnte den neuronalen Zellschaden minimieren. Außerdem besaßen MMP-9^{-/-} Mäuse im Vergleich zu dem Wildtyp-Mäusen einen geringeren neuronalen Schaden¹³⁰.

Matrix-Metalloproteinasen, insbesondere MMP-9 sind verantwortlich für den Abbau der extrazellulären Matrix, Folgen sind Hirnödem, Blutungen und Zelltod. Dass MMP-9, zumindest bei

der Maus, eine herausragende Rolle im Rahmen des selektiven neuronalen Zelltodes nach globaler cerebraler Ischämie spielt konnte anhand von Knockout-Mäusen gezeigt werden. MMP-9^{-/-} Mäuse waren im Gegensatz zu MMP-2^{-/-} Mäusen besser vor Ischämie und Trauma geschützt^{7,8,268}, in den Untersuchungen bestand eine Korrelation zwischen der Aktivierung von MMP-9 und dem Abbau von Laminin²⁸³. Kürzlich wurde postuliert, dass eine Trennung der Neurone von ihrer Matrix (Anoikis) möglicherweise eine entscheidende Rolle im Rahmen der Apoptose bei transienter cerebraler Ischämie im Hippocampus spielt. Es wurde gezeigt, dass extrazelluläre Matrixproteine wie Laminin wichtig für das Überleben einer Zelle und das Vermeiden einer Anoikis sind^{64,84}. MMP-9 gehört zu den Endopeptidasen, die insbesondere Laminin abbauen. Der Abbau von Laminin hat in den Studien von Guo et al. zu einer Trennung der hippocampalen Neurone von deren Matrix, also einer Anoikis geführt. Daraus kann abgeleitet werden, dass MMP-9 auf diesem Weg zur Apoptose nach cerebraler Ischämie beitragen.

5 Zusammenfassung

Die Subarachnoidalblutung ist eine verheerende neurologische Erkrankung und weltweit eine häufige Ursache für frühzeitige schwere Behinderung und Tod, in manchen Studien wird eine Mortalitätsrate von 70% beschrieben.

Der Begriff „früher Hirnschaden“ rückte in jüngster Vergangenheit immer mehr in den Fokus der Forschung, insbesondere nachdem die signifikante Hemmung des cerebralen Vasospasmus nach SAB zu keiner Verbesserung des Outcomes führte (CONSCIOUS-1 Studie). Unter dem „frühen Hirnschaden“ werden ischämische, inflammatorische und apoptotische Reaktionen zusammengefasst, die alle ein gemeinsames Ergebnis haben, den neuronalen Zelltod. Diese Reaktionen werden hauptsächlich für die hohe Mortalität und das schlechte Outcome nach einer Subarachnoidalblutung verantwortlich gemacht. Unter anderen tragen die Erhöhung des intrakraniellen Druckes, die Reduktion der cerebralen Durchblutung die Verminderung des cerebralen Perfusionsdruckes, der Abfall der Sauerstoffversorgung des Gehirns, der Zusammenbruch der Blut-Hirn-Schranke, das cerebrale Ödem und der Zelltod zum frühen Hirnschaden bei. Ein neuronaler Zellschaden trägt zum zytotoxischen Hirnödem bei, welches sich gewöhnlich sehr früh nach einer SAB entwickelt und Zeichen einer globalen Ischämie ist. Durch ICP-Erhöhung und Ischämie kommt es zu einer Blut-Hirn-Schrankenstörung, wahrscheinlich durch die endotheliale Apoptose. Der Zusammenbruch der Blut-Hirn-Schranke führt wiederum zu einem vasogenen Hirnödem.

In dieser Arbeit wurde der Einfluss von Bradykinin durch die Kinin B1 und B2 Rezeptoren und von Matrix-Metalloproteinase-9 auf die Entstehung des sekundären Hirnschadens nach Subarachnoidalblutung untersucht, mit der Hypothese, dass MMP-9^{-/-} und Bradykinin B2 Rezeptor Knockout-Mäuse einen geringeren sekundären Hirnschaden und damit ein besseres Outcome haben.

Bradykinin, ein aktiver Metabolit des Kallikrein-Kinin Systems und Mediator der frühen Entzündungsphase vermittelt seine Wirkung vorwiegend über den Kinin-B2 Rezeptor. Zahlreiche pharmakologische Studien mit Kinin-B2 Rezeptor Antagonisten und in letzter Zeit auch mit Knockout-Mäusen deuten daraufhin, dass Bradykinin über den B2 Rezeptor an der Entstehung des sekundären Hirnschadens und des cerebralen Ödems durch Permeabilitätssteigerung der Blut-Hirn-Schranke beteiligt ist.

MMP-9 sind extrazelluläre zink- und calciumabhängige Endopeptidasen, die unter physiologischen Bedingungen an der Steuerung des normalen Wachstums und der Entwicklung beteiligt sind, sie bauen die extrazelluläre Matrix und andere extrazelluläre Proteine ab und sind essentiell für

Wachstums- und Wundheilungsprozesse. Pathologisch erhöhte MMP-9 Konzentrationen in inflammatorischen Zellen und Endothelzellen des Gehirns können die Barrierefunktion der Blut-Hirn-Schranke herabsetzen, indem sie die vaskuläre Basalmembran schädigen und/oder die tight junctions der Endothelzellen abbauen, was zu einer erhöhten Gefäßpermeabilität führt. Sowohl beim ischämischen Schlaganfall, als auch beim Schädel-Hirn-Trauma und nach intracerebralen Blutungen wurde demonstriert, dass Matrix Metalloproteinasen in Form von Blut-Hirn-Schrankenstörungen und Hirnödemen wesentlich zum sekundären Hirnschaden beitragen.

Bisher lagen keine Untersuchungen vor, die sich mit dem Einfluss von Bradykinin oder MMP-9 an der Entstehung des sekundären Hirnschadens nach Subarachnoidalblutung befassen.

Mit Hilfe des modifizierten Fadenmodells nach Bederson wurde in den Knockout-Mäusen und den jeweiligen Wildtyp-Mäusen eine Subarachnoidalblutung induziert, anschließend wurden in Langzeit-Beobachtungen über sieben Tage, die Mortalität, das Gewicht und der neurologische Status der Mäuse beobachtet und die Gehirne histomorphometrisch untersucht. Außerdem wurden 24 Stunden nach SAB das Gewicht, der neurologische Status und der intrakranielle Druck erfasst und das Hirnödem gravimetrisch bestimmt.

Im Vergleich zu ihren Kontrollen besaßen die MMP-9^{-/-} Mäuse in den ersten 24 Stunden nach Induktion der Subarachnoidalblutung signifikant geringere neurologische Funktionsbeeinträchtigungen, obwohl auch sie am ersten Tag nach SAB im Vergleich zu den folgenden Tagen signifikant am meisten beeinträchtigt waren. Die FVB/N Kontrollen wiesen durchweg schwerste neurologische Ausfälle und ausgeprägte Bewusstseinsstörungen auf. Außerdem waren die ICP-Werte 24 Stunden nach SAB in den MMP-9^{-/-} Mäusen signifikant geringer als in den Wildtyp-Mäusen. MMP-9^{-/-} Mäuse verstarben innerhalb der ersten 72 Stunden nach der Blutung, danach nicht mehr, auch nicht in der für den Vasospasmus typischen Zeit ab dem 4. Tag nach SAB.

B2^{-/-} Mäuse waren nach Induktion der Subarachnoidalblutung in einem besseren Allgemeinzustand, hatten ein signifikant geringeres Hirnödem, geringer ausgeprägte neurologische Defizite und erholten sich schneller.

Diese Ergebnisse legen einen negativen Einfluss des Bradykinin-B2 Rezeptors im Rahmen der SAB nahe. Der B2 Rezeptor wurde schon wiederholt als wichtiger Mediator des cerebralen Ödems beschrieben. Dies konnte auch in diesen Untersuchungen zur Subarachnoidalblutung bestätigt werden. Interessanterweise ist die Beeinträchtigung, die die B1^{-/-} und B2^{-/-} Mäuse durch die Subarachnoidalblutung erfahren, sehr unterschiedlich. In unseren Langzeitversuchen lag die Mortalität der B1^{-/-} Mäuse bei 100%. Diese Ergebnisse legen den Verdacht nahe, dass der Kinin-B1

Rezeptor einen protektiven Effekt hinsichtlich der Entwicklung eines sekundären Hirnschadens im Rahmen einer Subarachnoidalblutung hat. Xia et al. veröffentlichten Studien, die eine Neuroprotektion durch eine Überexpression von Kallikrein im Gehirn zeigte^{276,277}, demnach könnte Bradykinin sowohl eine protektive wie destruktive Wirkung beim sekundären Hirnschaden vermitteln, wie auch unsere Arbeitsgruppe 2001 schon vermutet hatte¹⁸¹.

Die genauen Mechanismen, der durch Bradykinin bedingte Schädigung des Gehirns und ob Bradykinin neben der Permeabilitätserhöhung der Blut-Hirn-Schranke und der Entwicklung eines Hirnödems weitere Einflüsse ausübt, sind bis dato noch nicht hinreichend verstanden. Die Rolle des Bradykinin und seiner Rezeptoren scheint ambivalent zu sein. Diesbezüglich sind weitere Untersuchungen dringend erforderlich.

Entzündungsreaktionen nach einer Subarachnoidalblutung involvieren Bradykinin und MMP-9, beide führen per se zu einer Störung der Blut-Hirn-Schranke und zu einem vasogenen Hirnödem, was sich in einer Verschlechterung der Klinik manifestiert. Es scheint sogar ein Zusammenhang zwischen Bradykinin und der MMP-9 Expression zu existieren. Kürzlich zeigte eine Studie, dass Lipopolysaccharide oder Zytokine die Expression und Aktivität von MMP-9 in einer Ratten Astrozyten Kultur regulieren können. Diese Studie demonstriert, dass die Expression und Aktivierung von MMP-9 während Inflammation und Schädigung des Gehirns reguliert werden können⁹³. Die Bradykinin induzierte MMP-9 Expression wird demnach durch den Bradykinin-2 Rezeptor vermittelt.

Die Hypothese, dass MMP-9 und der Bradykinin 2 Rezeptor zum sekundären Hirnschaden nach Subarachnoidalblutung beitragen, konnte durch diese Untersuchung bestätigt werden. Die Identifizierung dieser Substanzen als Mediatoren des frühen Hirnschadens ist nicht nur von wissenschaftlichem Interesse, sondern auch von klinischer Bedeutung. Falls diese Substanzen den Verlauf einer primären Hirnverletzung sekundär verstärken, ergeben sich daraus Konsequenzen für die Entwicklung besserer Therapiemethoden.

6 Literaturverzeichnis

1. Abbott NJ. Inflammatory mediators and modulation of blood-brain barrier permeability. *Cell. Mol. Neurobiol.* 2000;20(2):131–147.
2. Abilleira S, Montaner J, Molina CA, u. a. Matrix metalloproteinase-9 concentration after spontaneous intracerebral hemorrhage. *J. Neurosurg.* 2003;99(1):65–70.
3. Alaraj A, Charbel FT, Amin-Hanjani S. Peri-operative measures for treatment and prevention of cerebral vasospasm following subarachnoid hemorrhage. *Neurol. Res.* 2009;31(6):651–659.
4. Alkan T, Korfali E, Kahveci N. Experimental subarachnoid haemorrhage models in rats. *Acta Neurochir. Suppl.* 2002;83:61–69.
5. Alvarez-Sabín J, Delgado P, Abilleira S, u. a. Temporal profile of matrix metalloproteinases and their inhibitors after spontaneous intracerebral hemorrhage: relationship to clinical and radiological outcome. *Stroke.* 2004;35(6):1316–1322.
6. Anthony DC, Ferguson B, Matyzak MK, u. a. Differential matrix metalloproteinase expression in cases of multiple sclerosis and stroke. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 1997;23(5):406–415.
7. Asahi M, Sumii T, Fini ME, Itohara S, Lo EH. Matrix metalloproteinase 2 gene knockout has no effect on acute brain injury after focal ischemia. *Neuroreport.* 2001;12(13):3003–3007.
8. Asahi M, Wang X, Mori T, u. a. Effects of matrix metalloproteinase-9 gene knock-out on the proteolysis of blood-brain barrier and white matter components after cerebral ischemia. *J. Neurosci.* 2001;21(19):7724–7732.
9. van Asch CJJ, van der Schaaf IC, Rinkel GJE. Acute hydrocephalus and cerebral perfusion after aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *AJNR Am J Neuroradiol.* 2010;31(1):67–70.
10. Auer RN, Wieloch T, Olsson Y, Siesjö BK. The distribution of hypoglycemic brain damage. *Acta Neuropathol.* 1984;64(3):177–191.
11. Ayer R, Zhang J. Connecting the early brain injury of aneurysmal subarachnoid hemorrhage to clinical practice. *Turk Neurosurg.* 2010;20(2):159–166.
12. Backstrom JR, Lim GP, Cullen MJ, Tökés ZA. Matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) is synthesized in neurons of the human hippocampus and is capable of degrading the amyloid-beta peptide (1-40). *J. Neurosci.* 1996;16(24):7910–7919.
13. Baethmann A, Kempfski OS. [Pathophysiology of brain edema]. *Zentralbl. Neurochir.* 1997;58(1):20–29.
14. Baethmann A, Maier-Hauff K, Kempfski O, u. a. Mediators of brain edema and secondary brain damage. *Crit. Care Med.* 1988;16(10):972–978.
15. Bailes JE, Spetzler RF, Hadley MN, Baldwin HZ. Management morbidity and mortality of poor-grade aneurysm patients. *J. Neurosurg.* 1990;72(4):559–566.
16. Barry KJ, Gogjian MA, Stein BM. Small animal model for investigation of subarachnoid

hemorrhage and cerebral vasospasm. *Stroke*. 1979;10(5):538–541.

17. Bazan NG, Rodriguez de Turco EB, Allan G. Mediators of injury in neurotrauma: intracellular signal transduction and gene expression. *J. Neurotrauma*. 1995;12(5):791–814.

18. Bederson JB, Connolly ES, Batjer HH, u. a. Guidelines for the management of aneurysmal subarachnoid hemorrhage: a statement for healthcare professionals from a special writing group of the Stroke Council, American Heart Association. *Stroke*. 2009;40(3):994–1025.

19. Bederson JB, Germano IM, Guarino L. Cortical blood flow and cerebral perfusion pressure in a new noncraniotomy model of subarachnoid hemorrhage in the rat. *Stroke*. 1995;26(6):1086–1091.

20. Bederson JB, Levy AL, Ding WH, u. a. Acute vasoconstriction after subarachnoid hemorrhage. *Neurosurgery*. 1998;42(2):352–360.

21. Bederson JB, Pitts LH, Tsuji M, u. a. Rat middle cerebral artery occlusion: evaluation of the model and development of a neurologic examination. *Stroke*. 1986;17(3):472–476.

22. Bermueller C, Thal SC, Plesnila N, u. a. Hypertonic fluid resuscitation from subarachnoid hemorrhage in rats: a comparison between small volume resuscitation and mannitol. *J. Neurol. Sci.* 2006;241(1-2):73–82.

23. Betz AL, Iannotti F, Hoff JT. Brain edema: a classification based on blood-brain barrier integrity. *Cerebrovasc Brain Metab Rev*. 1989;1(2):133–154.

24. Birkedal-Hansen H, Moore WG, Bodden MK, u. a. Matrix metalloproteinases: a review. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* 1993;4(2):197–250.

25. Black KL, Hoff JT. Leukotrienes increase blood-brain barrier permeability following intraparenchymal injections in rats. *Ann. Neurol.* 1985;18(3):349–351.

26. Boltze J, Kowalski I, Förschler A, u. a. The stairway: a novel behavioral test detecting sensorimotor stroke deficits in rats. *Artif Organs*. 2006;30(10):756–763.

27. Borkowski JA, Hess JF. Targeted disruption of the mouse B2 bradykinin receptor in embryonic stem cells. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 1995;73(7):773–779.

28. Borkowski JA, Ransom RW, Seabrook GR, u. a. Targeted disruption of a B2 bradykinin receptor gene in mice eliminates bradykinin action in smooth muscle and neurons. *J. Biol. Chem.* 1995;270(23):13706–13710.

29. Bradbury MW. The blood-brain barrier. *Exp. Physiol.* 1993;78(4):453–472.

30. Broderick JP, Brott TG, Duldner JE, Tomsick T, Leach A. Initial and recurrent bleeding are the major causes of death following subarachnoid hemorrhage. *Stroke*. 1994;25(7):1342–1347.

31. Brüssel T, Fitch W, Brodner G, Arendt I, Van Aken H. Effects of halothane in low concentrations on cerebral blood flow, cerebral metabolism, and cerebrovascular autoregulation in the baboon. *Anesth. Analg.* 1991;73(6):758–764.

32. Busch E, Beaulieu C, de Crespigny A, Moseley ME. Diffusion MR imaging during acute subarachnoid hemorrhage in rats. *Stroke*. 1998;29(10):2155–2161.

33. Busse R, Fleming I, Hecker M. Endothelium-derived bradykinin: implications for angiotensin-converting enzyme-inhibitor therapy. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 1993;22 Suppl 5:S31–36.
34. Busto R, Dietrich WD, Globus MY, Ginsberg MD. Postischemic moderate hypothermia inhibits CA1 hippocampal ischemic neuronal injury. *Neurosci. Lett.* 1989;101(3):299–304.
35. Busto R, Dietrich WD, Globus MY, u. a. Small differences in intras ischemic brain temperature critically determine the extent of ischemic neuronal injury. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 1987;7(6):729–738.
36. Cahill J, Cahill WJ, Calvert JW, Calvert JH, Zhang JH. Mechanisms of early brain injury after subarachnoid hemorrhage. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 2006;26(11):1341–1353.
37. Cahill J, Calvert JW, Marcantonio S, Zhang JH. p53 may play an orchestrating role in apoptotic cell death after experimental subarachnoid hemorrhage. *Neurosurgery.* 2007;60(3):531–545.
38. Cahill J, Zhang JH. Subarachnoid hemorrhage: is it time for a new direction? *Stroke.* 2009;40(3 Suppl):S86–87.
39. Cerf ME, Raidoo DM. Immunolocalization of plasma kallikrein in human brain. *Metab Brain Dis.* 2000;15(4):315–323.
40. Chan Y, Walmsley RP. Learning and understanding the Kruskal-Wallis one-way analysis-of-variance-by-ranks test for differences among three or more independent groups. *Phys Ther.* 1997;77(12):1755–1762.
41. Chao J, Chao L, Swain CC, Tsai J, Margolius HS. Tissue kallikrein in rat brain and pituitary: regional distribution and estrogen induction in the anterior pituitary. *Endocrinology.* 1987;120(2):475–482.
42. Chappell ET, Moure FC, Good MC. Comparison of computed tomographic angiography with digital subtraction angiography in the diagnosis of cerebral aneurysms: a meta-analysis. *Neurosurgery.* 2003;52(3):624–631.
43. Cholewinski AJ, Stevens G, McDermott AM, Wilkin GP. Identification of B2 bradykinin binding sites on cultured cortical astrocytes. *J. Neurochem.* 1991;57(4):1456–1458.
44. Claassen J, Carhuapoma JR, Kreiter KT, u. a. Global cerebral edema after subarachnoid hemorrhage: frequency, predictors, and impact on outcome. *Stroke.* 2002;33(5):1225–1232.
45. Connolly ES, Winfree CJ, Stern DM, Solomon RA, Pinsky DJ. Procedural and strain-related variables significantly affect outcome in a murine model of focal cerebral ischemia. *Neurosurgery.* 1996;38(3):523–531.
46. Corbett D, Nurse S. The problem of assessing effective neuroprotection in experimental cerebral ischemia. *Prog. Neurobiol.* 1998;54(5):531–548.
47. Coussens LM, Fingleton B, Matrisian LM. Matrix metalloproteinase inhibitors and cancer: trials and tribulations. *Science.* 2002;295(5564):2387–2392.
48. Couture R, Harrison M, Vianna RM, Cloutier F. Kinin receptors in pain and inflammation. *Eur. J. Pharmacol.* 2001;429(1-3):161–176.

49. Cuzner ML, Gveric D, Strand C, u. a. The expression of tissue-type plasminogen activator, matrix metalloproteases and endogenous inhibitors in the central nervous system in multiple sclerosis: comparison of stages in lesion evolution. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 1996;55(12):1194–1204.
50. Delgado TJ, Brismar J, Svendgaard NA. Subarachnoid haemorrhage in the rat: angiography and fluorescence microscopy of the major cerebral arteries. *Stroke.* 1985;16(4):595–602.
51. Dennis LJ, Mayer SA. Diagnosis and management of increased intracranial pressure. *Neurol India.* 2001;49 Suppl 1:S37–50.
52. Dietrich WD, Busto R, Halley M, Valdes I. The importance of brain temperature in alterations of the blood-brain barrier following cerebral ischemia. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 1990;49(5):486–497.
53. Ding-Zhou L, Margail I, Palmier B, u. a. LF 16-0687 Ms, a bradykinin B2 receptor antagonist, reduces ischemic brain injury in a murine model of transient focal cerebral ischemia. *Br. J. Pharmacol.* 2003;139(8):1539–1547.
54. 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.* 1989;9(5):589–596.
55. Dóczi T. The pathogenetic and prognostic significance of blood-brain barrier damage at the acute stage of aneurysmal subarachnoid haemorrhage. Clinical and experimental studies. *Acta Neurochir (Wien).* 1985;77(3-4):110–132.
56. Dóczi TP. Impact of cerebral microcirculatory changes on cerebral blood flow during cerebral vasospasm after aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Stroke.* 2001;32(3):817.
57. Doetschman T. Interpretation of phenotype in genetically engineered mice. *Lab. Anim. Sci.* 1999;49(2):137–143.
58. Edlow JA, Caplan LR. Avoiding pitfalls in the diagnosis of subarachnoid hemorrhage. *N. Engl. J. Med.* 2000;342(1):29–36.
59. Eyre JA, Essex TJ, Flecknell PA, Bartholomew PH, Sinclair JJ. A comparison of measurements of cerebral blood flow in the rabbit using laser Doppler spectroscopy and radionuclide labelled microspheres. *Clin Phys Physiol Meas.* 1988;9(1):65–74.
60. Fisher CM, Kistler JP, Davis JM. Relation of cerebral vasospasm to subarachnoid hemorrhage visualized by computerized tomographic scanning. *Neurosurgery.* 1980;6(1):1–9.
61. Fisher CM. Clinical syndromes in cerebral thrombosis, hypertensive hemorrhage, and ruptured saccular aneurysm. *Clin Neurosurg.* 1975;22:117–147.
62. Frerichs KU, Feuerstein GZ. Laser-Doppler flowmetry. A review of its application for measuring cerebral and spinal cord blood flow. *Mol. Chem. Neuropathol.* 1990;12(1):55–70.
63. Friedrich B, Müller F, Feiler S, Schöller K, Plesnila N. Experimental subarachnoid hemorrhage causes early and long-lasting microarterial constriction and microthrombosis: an in-vivo microscopy study. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 2012;32(3):447–455.

64. Frisch SM, Francis H. Disruption of epithelial cell-matrix interactions induces apoptosis. *J. Cell Biol.* 1994;124(4):619–626.
65. Fujii M, Yan J, Rolland WB, u. a. Early brain injury, an evolving frontier in subarachnoid hemorrhage research. *Transl Stroke Res.* 2013;4(4):432–446.
66. Fujimura M, Gasche Y, Morita-Fujimura Y, u. a. Early appearance of activated matrix metalloproteinase-9 and blood-brain barrier disruption in mice after focal cerebral ischemia and reperfusion. *Brain Res.* 1999;842(1):92–100.
67. Fukuda O, Endo S, Kuwayama N, Harada J, Takaku A. The characteristics of laser-Doppler flowmetry for the measurement of regional cerebral blood flow. *Neurosurgery.* 1995;36(2):358–364.
68. Gaddis ML, Gaddis GM. Introduction to biostatistics: Part 6, Correlation and regression. *Ann Emerg Med.* 1990;19(12):1462–1468.
69. Germanó A, d' Avella D, Cicciarello R, Hayes RL, Tomasello F. Blood-brain barrier permeability changes after experimental subarachnoid hemorrhage. *Neurosurgery.* 1992;30(6):882–886.
70. Germanò A, d' Avella D, Imperatore C, Caruso G, Tomasello F. Time-course of blood-brain barrier permeability changes after experimental subarachnoid haemorrhage. *Acta Neurochir (Wien).* 2000;142(5):575–580.
71. Germanò A, Costa C, DeFord SM, u. a. Systemic administration of a calpain inhibitor reduces behavioral deficits and blood-brain barrier permeability changes after experimental subarachnoid hemorrhage in the rat. *J. Neurotrauma.* 2002;19(7):887–896.
72. Germanò A, Imperatore C, d' Avella D, Costa G, Tomasello F. Antivasospastic and brain-protective effects of a hydroxyl radical scavenger (AVS) after experimental subarachnoid hemorrhage. *J. Neurosurg.* 1998;88(6):1075–1081.
73. Gijbels K, Galardy RE, Steinman L. Reversal of experimental autoimmune encephalomyelitis with a hydroxamate inhibitor of matrix metalloproteases. *J. Clin. Invest.* 1994;94(6):2177–2182.
74. van Gijn J, van Dongen KJ, Vermeulen M, Hijdra A. Perimesencephalic hemorrhage: a nonaneurysmal and benign form of subarachnoid hemorrhage. *Neurology.* 1985;35(4):493–497.
75. van Gijn J, Kerr RS, Rinkel GJE. Subarachnoid haemorrhage. *Lancet.* 2007;369(9558):306–318.
76. van Gijn J, Rinkel GJ. Subarachnoid haemorrhage: diagnosis, causes and management. *Brain.* 2001;124(Pt 2):249–278.
77. Görlach C, Hortobágyi T, Hortobágyi S, u. a. Bradykinin B2, but not B1, receptor antagonism has a neuroprotective effect after brain injury. *J. Neurotrauma.* 2001;18(8):833–838.
78. Görlach C, Hortobágyi T, Hortobágyi S, u. a. Bradykinin B2, but not B1, receptor antagonism has a neuroprotective effect after brain injury. *J. Neurotrauma.* 2001;18(8):833–838.
79. Gottschall PE, Deb S. Regulation of matrix metalloproteinase expressions in astrocytes,

- microglia and neurons. *Neuroimmunomodulation*. 1996;3(2-3):69–75.
80. Gröger M, Lebesgue D, Pruneau D, u. a. Release of bradykinin and expression of kinin B2 receptors in the brain: role for cell death and brain edema formation after focal cerebral ischemia in mice. *J. Cereb. Blood Flow Metab*. 2005;25(8):978–989.
81. Gröger M, Lebesgue D, Pruneau D, u. a. Release of bradykinin and expression of kinin B2 receptors in the brain: role for cell death and brain edema formation after focal cerebral ischemia in mice. *J. Cereb. Blood Flow Metab*. 2005;25(8):978–989.
82. Gröger M, Lebesgue D, Pruneau D, u. a. Release of bradykinin and expression of kinin B2 receptors in the brain: role for cell death and brain edema formation after focal cerebral ischemia in mice. *J. Cereb. Blood Flow Metab*. 2005;25(8):978–989.
83. Grote E, Hassler W. The critical first minutes after subarachnoid hemorrhage. *Neurosurgery*. 1988;22(4):654–661.
84. Gu Z, Cui J, Brown S, u. a. A highly specific inhibitor of matrix metalloproteinase-9 rescues laminin from proteolysis and neurons from apoptosis in transient focal cerebral ischemia. *J. Neurosci*. 2005;25(27):6401–6408.
85. Gules I, Satoh M, Nanda A, Zhang JH. Apoptosis, blood-brain barrier, and subarachnoid hemorrhage. *Acta Neurochir. Suppl*. 2003;86:483–487.
86. Guo Z, Sun X, He Z, Jiang Y, Zhang X. Role of matrix metalloproteinase-9 in apoptosis of hippocampal neurons in rats during early brain injury after subarachnoid hemorrhage. *Neurol. Sci*. 2010;31(2):143–149.
87. Guo Z, Sun X, Zhang JH. Mechanisms of early brain injury after SAH: matrix metalloproteinase 9. *Acta Neurochir. Suppl*. 2011;110(Pt 1):63–65.
88. Haberl RL, Heizer ML, Ellis EF. Laser-Doppler assessment of brain microcirculation: effect of local alterations. *Am. J. Physiol*. 1989;256(4 Pt 2):H1255–1260.
89. Hamann GF, del Zoppo GJ, von Kummer R. Hemorrhagic transformation of cerebral infarction--possible mechanisms. *Thromb. Haemost*. 1999;82 Suppl 1:92–94.
90. Hellal F, Pruneau D, Palmier B, u. a. Detrimental role of bradykinin B2 receptor in a murine model of diffuse brain injury. *J. Neurotrauma*. 2003;20(9):841–851.
91. Heo JH, Lucero J, Abumiya T, u. a. Matrix metalloproteinases increase very early during experimental focal cerebral ischemia. *J. Cereb. Blood Flow Metab*. 1999;19(6):624–633.
92. Hoffman WE, Thomas C, Albrecht RF. The effect of halothane and isoflurane on neurologic outcome following incomplete cerebral ischemia in the rat. *Anesth. Analg*. 1993;76(2):279–283.
93. Hsieh H-L, Yen M-H, Jou M-J, Yang C-M. Intracellular signalings underlying bradykinin-induced matrix metalloproteinase-9 expression in rat brain astrocyte-1. *Cell. Signal*. 2004;16(10):1163–1176.
94. Hsu J-YC, Bourguignon LYW, Adams CM, u. a. Matrix metalloproteinase-9 facilitates glial scar formation in the injured spinal cord. *J. Neurosci*. 2008;28(50):13467–13477.

95. Hunt WE, Hess RM. Surgical risk as related to time of intervention in the repair of intracranial aneurysms. *J. Neurosurg.* 1968;28(1):14–20.
96. Imperatore C, Germanò A, d'Avella D, Tomasello F, Costa G. Effects of the radical scavenger AVS on behavioral and BBB changes after experimental subarachnoid hemorrhage. *Life Sci.* 2000;66(9):779–790.
97. Ingall T, Asplund K, Mähönen M, Bonita R. A multinational comparison of subarachnoid hemorrhage epidemiology in the WHO MONICA stroke study. *Stroke.* 2000;31(5):1054–1061.
98. Jackowski A, Crockard A, Burnstock G, Russell RR, Kristek F. The time course of intracranial pathophysiological changes following experimental subarachnoid haemorrhage in the rat. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 1990;10(6):835–849.
99. Jeon H, Ai J, Sabri M, u. a. Neurological and neurobehavioral assessment of experimental subarachnoid hemorrhage. *BMC Neurosci.* 2009;10:103.
100. Johnson WD, Bolognese P, Miller JJ, u. a. Continuous postoperative ICBF monitoring in aneurysmal SAH patients using a combined ICP-laser Doppler fiberoptic probe. *J Neurosurg Anesthesiol.* 1996;8(3):199–207.
101. Kader A, Krauss WE, Onesti ST, Elliott JP, Solomon RA. Chronic cerebral blood flow changes following experimental subarachnoid hemorrhage in rats. *Stroke.* 1990;21(4):577–581.
102. Kakinuma Y, Hama H, Sugiyama F, u. a. Impaired blood-brain barrier function in angiotensinogen-deficient mice. *Nat. Med.* 1998;4(9):1078–1080.
103. Kamiya K, Kuyama H, Symon L. An experimental study of the acute stage of subarachnoid hemorrhage. *J. Neurosurg.* 1983;59(6):917–924.
104. Kamiya T, Katayama Y, Kashiwagi F, Terashi A. The role of bradykinin in mediating ischemic brain edema in rats. *Stroke.* 1993;24(4):571–575.
105. Kamiya T, Katayama Y, Shimizu J, u. a. Studies on relation of bradykinin to ischemic brain edema in stroke-resistant spontaneously hypertensive rat. *Adv Neurol.* 1990;52:543.
106. Kamiya T. [Studies on the involvement of bradykinin in the formation of ischemic brain edema]. *Nippon Ika Daigaku Zasshi.* 1990;57(2):180–191.
107. Kaplanski J, Asa I, Artru AA, u. a. LF 16-0687 Ms, a new bradykinin B2 receptor antagonist, decreases ex vivo brain tissue prostaglandin E2 synthesis after closed head trauma in rats. *Resuscitation.* 2003;56(2):207–213.
108. Kaplanski J, Pruneau D, Asa I, u. a. LF 16-0687 Ms, a bradykinin B2 receptor antagonist, reduces brain edema and improves long-term neurological function recovery after closed head trauma in rats. *J. Neurotrauma.* 2002;19(8):953–964.
109. Kapp J, Mahaley MS, Odom GL. Cerebral arterial spasm. 2. Experimental evaluation of mechanical and humoral factors in pathogenesis. *J. Neurosurg.* 1968;29(4):339–349.
110. Karibe H, Sato K, Shimizu H, u. a. Intraoperative mild hypothermia ameliorates postoperative cerebral blood flow impairment in patients with aneurysmal subarachnoid hemorrhage.

Neurosurgery. 2000;47(3):594–599.

111. Kassell NF, Torner JC, Haley EC, u. a. The International Cooperative Study on the Timing of Aneurysm Surgery. Part 1: Overall management results. *J. Neurosurg*. 1990;73(1):18–36.

112. Kasuya H, Shimizu T, Okada T, u. a. Activation of the coagulation system in the subarachnoid space after subarachnoid haemorrhage: serial measurement of fibrinopeptide A and bradykinin of cerebrospinal fluid and plasma in patients with subarachnoid haemorrhage. *Acta Neurochir (Wien)*. 1988;91(3-4):120–125.

113. Katz L, U, Safar P, Radovsky A, Neumar R. Outcome model of asphyxial cardiac arrest in rats. *J. Cereb. Blood Flow Metab*. 1995;15(6):1032–1039.

114. Keep RF, Andjelkovic AV, Stamatovic SM, Shakui P, Ennis SR. Ischemia-induced endothelial cell dysfunction. *Acta Neurochir. Suppl*. 2005;95:399–402.

115. Kempinski O, von Andrian U, Schürer L, Baethmann A. Intravenous glutamate enhances edema formation after a freezing lesion. *Adv Neurol*. 1990;52:219–223.

116. Khan IM, Yamaji I, Miller DH, Margolius HS, Privitera PJ. Cerebrospinal fluid kallikrein in spontaneously hypertensive and desoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats. *J. Hypertens*. 1993;11(10):1039–1045.

117. Khechinashvili G, Asplund K. Electrocardiographic changes in patients with acute stroke: a systematic review. *Cerebrovasc. Dis*. 2002;14(2):67–76.

118. Kizuki K, Suzuki T, Kudo M, Noguchi T. Immunohistochemical demonstration of tissue kallikrein in the neurons of rat brain. *Brain Res*. 1994;634(2):305–309.

119. Kizuki K, Suzuki T, Sugaya K, Noguchi T, Kudo M. Tissue kallikrein in rat and mouse neurons. *Braz. J. Med. Biol. Res*. 1994;27(8):1891–1896.

120. Klatzo I, Piraux A, Laskowski EJ. The relationship between edema, blood-brain-barrier and tissue elements in a local brain injury. *J. Neuropathol. Exp. Neurol*. 1958;17(4):548–564.

121. Klatzo I. Evolution of brain edema concepts. *Acta Neurochir Suppl (Wien)*. 1994;60:3–6.

122. Klatzo I. Presidential address. Neuropathological aspects of brain edema. *J. Neuropathol. Exp. Neurol*. 1967;26(1):1–14.

123. Klatzo I. Pathophysiological aspects of brain edema. *Acta Neuropathol*. 1987;72(3):236–239.

124. Kreiter KT, Copeland D, Bernardini GL, u. a. Predictors of cognitive dysfunction after subarachnoid hemorrhage. *Stroke*. 2002;33(1):200–208.

125. Kusaka G, Ishikawa M, Nanda A, Granger DN, Zhang JH. Signaling pathways for early brain injury after subarachnoid hemorrhage. *J. Cereb. Blood Flow Metab*. 2004;24(8):916–925.

126. Lacy PS, Earle AM. A correlation between multiple unit activity in the hypothalamus and electrocardiographic changes during a subarachnoid hemorrhage. *Brain Res*. 1986;373(1-2):146–152.

127. Langfitt TW, Weinstein JD, Kassel NF, Simeone FA. Transmission of increased intracranial pressure within the craniospinal axis. *J. Neurosurg.* 1964;21:989–997.
128. Lanzino G, Kassell NF. Double-blind, randomized, vehicle-controlled study of high-dose tirilazad mesylate in women with aneurysmal subarachnoid hemorrhage. Part II. A cooperative study in North America. *J. Neurosurg.* 1999;90(6):1018–1024.
129. Lee KY, Kim EH, Yang WS, u. a. Persistent increase of matrix metalloproteinases in cerebrospinal fluid of tuberculous meningitis. *J. Neurol. Sci.* 2004;220(1-2):73–78.
130. Lee S-R, Tsuji K, Lee S-R, Lo EH. Role of matrix metalloproteinases in delayed neuronal damage after transient global cerebral ischemia. *J. Neurosci.* 2004;24(3):671–678.
131. Lehmberg J, Beck J, Baethmann A, Uhl E. Influence of the bradykinin B1/B2-receptor-antagonist B 9430 on the cerebral microcirculation and outcome of gerbils from global cerebral ischemia. *Acta Neurochir. Suppl.* 2000;76:39–41.
132. Leib SL, Leppert D, Clements J, Täuber MG. Matrix metalloproteinases contribute to brain damage in experimental pneumococcal meningitis. *Infect. Immun.* 2000;68(2):615–620.
133. Lenzlinger PM, Saatman KE, Hoover RC, u. a. Inhibition of vascular endothelial growth factor receptor (VEGFR) signaling by BSF476921 attenuates regional cerebral edema following traumatic brain injury in rats. *Restor. Neurol. Neurosci.* 2004;22(2):73–79.
134. Leppert D, Ford J, Stabler G, u. a. Matrix metalloproteinase-9 (gelatinase B) is selectively elevated in CSF during relapses and stable phases of multiple sclerosis. *Brain.* 1998;121 (Pt 12):2327–2334.
135. Leppert D, Leib SL, Grygar C, u. a. Matrix metalloproteinase (MMP)-8 and MMP-9 in cerebrospinal fluid during bacterial meningitis: association with blood-brain barrier damage and neurological sequelae. *Clin. Infect. Dis.* 2000;31(1):80–84.
136. Leppert D, Lindberg RL, Kappos L, Leib SL. Matrix metalloproteinases: multifunctional effectors of inflammation in multiple sclerosis and bacterial meningitis. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 2001;36(2-3):249–257.
137. Lim GP, Backstrom JR, Cullen MJ, u. a. Matrix metalloproteinases in the neocortex and spinal cord of amyotrophic lateral sclerosis patients. *J. Neurochem.* 1996;67(1):251–259.
138. Liuzzi GM, Mastroianni CM, Santacrose MP, u. a. Increased activity of matrix metalloproteinases in the cerebrospinal fluid of patients with HIV-associated neurological diseases. *J. Neurovirol.* 2000;6(2):156–163.
139. Liuzzi GM, Trojano M, Fanelli M, u. a. Intrathecal synthesis of matrix metalloproteinase-9 in patients with multiple sclerosis: implication for pathogenesis. *Mult. Scler.* 2002;8(3):222–228.
140. Ljunggren B, Säveland H, Brandt L. Causes of unfavorable outcome after early aneurysm operation. *Neurosurgery.* 1983;13(6):629–633.
141. Lo EH, Wang X, Cuzner ML. Extracellular proteolysis in brain injury and inflammation: role for plasminogen activators and matrix metalloproteinases. *J. Neurosci. Res.* 2002;69(1):1–9.

142. Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, Cummins R. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke*. 1989;20(1):84–91.
143. Lorenzl S, Ködel U, Frei K, Pfister HW. Effect of the bradykinin B2 receptor antagonist Hoe140 in experimental pneumococcal meningitis in the rat. *Eur. J. Pharmacol.* 1996;308(3):335–341.
144. Mack WJ, King RG, Ducruet AF, et al. Intracranial pressure following aneurysmal subarachnoid hemorrhage: monitoring practices and outcome data. *Neurosurg Focus*. 2003;14(4):e3.
145. Maeda A, Sobel RA. Matrix metalloproteinases in the normal human central nervous system, microglial nodules, and multiple sclerosis lesions. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 1996;55(3):300–309.
146. Mahabeer R, Naidoo S, Raidoo DM. Detection of tissue kallikrein and kinin B1 and B2 receptor mRNAs in human brain by in situ RT-PCR. *Metab Brain Dis.* 2000;15(4):325–335.
147. Marceau F, Hess JF, Bachvarov DR. The B1 receptors for kinins. *Pharmacol. Rev.* 1998;50(3):357–386.
148. Marceau F, Lussier A, Regoli D, Giroud JP. Pharmacology of kinins: their relevance to tissue injury and inflammation. *Gen. Pharmacol.* 1983;14(2):209–229.
149. Marzatico F, Gaetani P, Rodriguez y Baena R, et al. Experimental subarachnoid hemorrhage. Lipid peroxidation and Na⁺,K⁺-ATPase in different rat brain areas. *Mol. Chem. Neuropathol.* 1989;11(2):99–107.
150. Meguro T, Clower BR, Carpenter R, Parent AD, Zhang JH. Improved rat model for cerebral vasospasm studies. *Neurol. Res.* 2001;23(7):761–766.
151. Megyesi JF, Vollrath B, Cook DA, Findlay JM. In vivo animal models of cerebral vasospasm: a review. *Neurosurgery*. 2000;46(2):448–460.
152. Menzies SA, Hoff JT, Betz AL. Middle cerebral artery occlusion in rats: a neurological and pathological evaluation of a reproducible model. *Neurosurgery*. 1992;31(1):100–106.
153. Meyer CH, Lowe D, Meyer M, Richardson PL, Neil-Dwyer G. Progressive change in cerebral blood flow during the first three weeks after subarachnoid hemorrhage. *Neurosurgery*. 1983;12(1):58–76.
154. Middleton K, Esselman P, Lim PC. Terson syndrome: an underrecognized cause of reversible vision loss in patients with subarachnoid hemorrhage. *Am J Phys Med Rehabil.* 2012;91(3):271–274.
155. Milhorat TH. Acute hydrocephalus after aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Neurosurgery*. 1987;20(1):15–20.
156. Mori T, Wang X, Aoki T, Lo EH. Downregulation of matrix metalloproteinase-9 and attenuation of edema via inhibition of ERK mitogen activated protein kinase in traumatic brain injury. *J. Neurotrauma*. 2002;19(11):1411–1419.

157. Morita-Fujimura Y, Fujimura M, Gasche Y, Copin JC, Chan PH. Overexpression of copper and zinc superoxide dismutase in transgenic mice prevents the induction and activation of matrix metalloproteinases after cold injury-induced brain trauma. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 2000;20(1):130–138.
158. Mun-Bryce S, Rosenberg GA. Gelatinase B modulates selective opening of the blood-brain barrier during inflammation. *Am. J. Physiol.* 1998;274(5 Pt 2):R1203–1211.
159. Nagel A, Graetz D, Vajkoczy P, Sarrafzadeh AS. Decompressive craniectomy in aneurysmal subarachnoid hemorrhage: relation to cerebral perfusion pressure and metabolism. *Neurocrit Care.* 2009;11(3):384–394.
160. Nakagomi T, Kassell NF, Sasaki T, u. a. Time course of the blood-arterial wall barrier disruption following experimental subarachnoid haemorrhage. *Acta Neurochir (Wien).* 1989;98(3-4):176–183.
161. Nilsson OG, Lindgren A, Ståhl N, Brandt L, Säveland H. Incidence of intracerebral and subarachnoid haemorrhage in southern Sweden. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatr.* 2000;69(5):601–607.
162. Noble LJ, Donovan F, Igarashi T, Goussev S, Werb Z. Matrix metalloproteinases limit functional recovery after spinal cord injury by modulation of early vascular events. *J. Neurosci.* 2002;22(17):7526–7535.
163. Noda M, Kariura Y, Amano T, u. a. Expression and function of bradykinin receptors in microglia. *Life Sci.* 2003;72(14):1573–1581.
164. Nornes H. The role of intracranial pressure in the arrest of hemorrhage in patients with ruptured intracranial aneurysm. *J. Neurosurg.* 1973;39(2):226–234.
165. Nornes H. Cerebral arterial flow dynamics during aneurysm haemorrhage. *Acta Neurochir (Wien).* 1978;41(1-3):39–48.
166. Onoue H, Kaito N, Tomii M, u. a. Human basilar and middle cerebral arteries exhibit endothelium-dependent responses to peptides. *Am. J. Physiol.* 1994;267(3 Pt 2):H880–886.
167. Orakcioglu B, Fiebach JB, Steiner T, u. a. Evolution of early perihemorrhagic changes--ischemia vs. edema: an MRI study in rats. *Exp. Neurol.* 2005;193(2):369–376.
168. Ostrowski RP, Colohan AR, Zhang JH. Molecular mechanisms of early brain injury after subarachnoid hemorrhage. *Neurol. Res.* 2006;28(4):399–414.
169. Oury TD, Piantadosi CA, Crapo JD. Cold-induced brain edema in mice. Involvement of extracellular superoxide dismutase and nitric oxide. *J. Biol. Chem.* 1993;268(21):15394–15398.
170. Pan W, Kastin AJ, Gera L, Stewart JM. Bradykinin antagonist decreases early disruption of the blood-spinal cord barrier after spinal cord injury in mice. *Neurosci. Lett.* 2001;307(1):25–28.
171. Parfenova H, Massie V, Leffler CW. Developmental changes in endothelium-derived vasorelaxant factors in cerebral circulation. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2000;278(3):H780–788.

172. Park J-W, Jang Y-H, Kim J-M, u. a. Green tea polyphenol (-)-epigallocatechin gallate reduces neuronal cell damage and up-regulation of MMP-9 activity in hippocampal CA1 and CA2 areas following transient global cerebral ischemia. *J. Neurosci. Res.* 2009;87(2):567–575.
173. Park S, Yamaguchi M, Zhou C, u. a. Neurovascular protection reduces early brain injury after subarachnoid hemorrhage. *Stroke.* 2004;35(10):2412–2417.
174. Park S, Yamaguchi M, Zhou C, u. a. Neurovascular protection reduces early brain injury after subarachnoid hemorrhage. *Stroke.* 2004;35(10):2412–2417.
175. Parpura V, Basarsky TA, Liu F, u. a. Glutamate-mediated astrocyte-neuron signalling. *Nature.* 1994;369(6483):744–747.
176. Paulson OB, Strandgaard S, Edvinsson L. Cerebral autoregulation. *Cerebrovasc Brain Metab Rev.* 1990;2(2):161–192.
177. Peterson EW, Cardoso ER. The blood-brain barrier following experimental subarachnoid hemorrhage. Part 1: Response to insult caused by arterial hypertension. *J. Neurosurg.* 1983;58(3):338–344.
178. Peterson EW, Cardoso ER. The blood-brain barrier following experimental subarachnoid hemorrhage. Part 1: Response to insult caused by arterial hypertension. *J. Neurosurg.* 1983;58(3):338–344.
179. Pickard JD, Murray GD, Illingworth R, u. a. Effect of oral nimodipine on cerebral infarction and outcome after subarachnoid haemorrhage: British aneurysm nimodipine trial. *BMJ.* 1989;298(6674):636–642.
180. Piepgras A, Thomé C, Schmiedek P. Characterization of an anterior circulation rat subarachnoid hemorrhage model. *Stroke.* 1995;26(12):2347–2352.
181. Plesnila N, Schulz J, Stoffel M, u. a. Role of bradykinin B2 receptors in the formation of vasogenic brain edema in rats. *J. Neurotrauma.* 2001;18(10):1049–1058.
182. Plesnila N, Schulz J, Stoffel M, u. a. Role of bradykinin B2 receptors in the formation of vasogenic brain edema in rats. *J. Neurotrauma.* 2001;18(10):1049–1058.
183. Pluznik DH, Fridman R, Reich R. Correlation in the expression of type IV collagenase and the invasive and chemotactic abilities of myelomonocytic cells during differentiation into macrophages. *Exp. Hematol.* 1992;20(1):57–63.
184. Pobereskin LH. Incidence and outcome of subarachnoid haemorrhage: a retrospective population based study. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatr.* 2001;70(3):340–343.
185. Pruneau D, Chorny I, Benkovitz V, u. a. Effect of LF 16-0687MS, a new nonpeptide bradykinin B2 receptor antagonist, in a rat model of closed head trauma. *J. Neurotrauma.* 1999;16(11):1057–1065.
186. Prunell GF, Mathiesen T, Diemer NH, Svendgaard N-A. Experimental subarachnoid hemorrhage: subarachnoid blood volume, mortality rate, neuronal death, cerebral blood flow, and perfusion pressure in three different rat models. *Neurosurgery.* 2003;52(1):165–175.

187. Prunell GF, Mathiesen T, Svendgaard N-A. A new experimental model in rats for study of the pathophysiology of subarachnoid hemorrhage. *Neuroreport*. 2002;13(18):2553–2556.
188. Prunell GF, Svendgaard N-A, Alkass K, Mathiesen T. Delayed cell death related to acute cerebral blood flow changes following subarachnoid hemorrhage in the rat brain. *J. Neurosurg*. 2005;102(6):1046–1054.
189. Raidoo D, Ramchurren N, Naidoo Y, u. a. Visualisation of bradykinin B2 receptors on human brain neurons. *Immunopharmacology*. 1996;33(1-3):104–107.
190. Raidoo DM, Ramsaroop R, Naidoo S, Bhoola KD. Regional distribution of tissue kallikrein in the human brain. *Immunopharmacology*. 1996;32(1-3):39–47.
191. Raidoo DM, Ramsaroop R, Naidoo S, Müller-Esterl W, Bhoola KD. Kinin receptors in human vascular tissue: their role in atheromatous disease. *Immunopharmacology*. 1997;36(2-3):153–160.
192. Ram Z, Sahar A, Hadani M. Vasospasm due to massive subarachnoid haemorrhage--a rat model. *Acta Neurochir (Wien)*. 1991;110(3-4):181–184.
193. Rasmussen G, Hauerberg J, Waldemar G, Gjerris F, Juhler M. Cerebral blood flow autoregulation in experimental subarachnoid haemorrhage in rat. *Acta Neurochir (Wien)*. 1992;119(1-4):128–133.
194. Raymond JJ, Robertson DM, Dinsdale HB. Pharmacological modification of bradykinin induced breakdown of the blood-brain barrier. *Can J Neurol Sci*. 1986;13(3):214–220.
195. Reese TS, Karnovsky MJ. Fine structural localization of a blood-brain barrier to exogenous peroxidase. *J. Cell Biol*. 1967;34(1):207–217.
196. Regoli D, Barabé J. Pharmacology of bradykinin and related kinins. *Pharmacol. Rev*. 1980;32(1):1–46.
197. Regoli D, Jukic D, Tousignant C, Rhaleb NE. Kinin receptor classification. *Agents Actions Suppl*. 1992;38 (Pt 1):475–486.
198. Regoli D, Rizzi A, Perron SI, Gobeil F Jr. Classification of kinin receptors. *Biol. Chem*. 2001;382(1):31–35.
199. Reichardt M. Zur Entstehung des Hirndrucks bei Hirngeschwülsten und anderen Hirnkrankheiten und über eine bei diesen zu beobachtende besondere Art der Hirnschwellung. 1905;28(2):306–355.
200. Relton JK, Beckey VE, Hanson WL, Whalley ET. CP-0597, a selective bradykinin B2 receptor antagonist, inhibits brain injury in a rat model of reversible middle cerebral artery occlusion. *Stroke*. 1997;28(7):1430–1436.
201. Risau W, Esser S, Engelhardt B. Differentiation of blood-brain barrier endothelial cells. *Pathol. Biol*. 1998;46(3):171–175.
202. de Rooij NK, Linn FHH, van der Plas JA, Algra A, Rinkel GJE. Incidence of subarachnoid haemorrhage: a systematic review with emphasis on region, age, gender and time trends. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatr*. 2007;78(12):1365–1372.

203. Rosell A, Ortega-Aznar A, Alvarez-Sabín J, u. a. Increased brain expression of matrix metalloproteinase-9 after ischemic and hemorrhagic human stroke. *Stroke*. 2006;37(6):1399–1406.
204. Rosenberg GA, Dencoff JE, Correa N, Reiners M, Ford CC. Effect of steroids on CSF matrix metalloproteinases in multiple sclerosis: relation to blood-brain barrier injury. *Neurology*. 1996;46(6):1626–1632.
205. Rosenberg GA, Dencoff JE, McGuire PG, Liotta LA, Stetler-Stevenson WG. Injury-induced 92-kilodalton gelatinase and urokinase expression in rat brain. *Lab. Invest*. 1994;71(3):417–422.
206. Rosenberg GA, Estrada EY, Dencoff JE. Matrix metalloproteinases and TIMPs are associated with blood-brain barrier opening after reperfusion in rat brain. *Stroke*. 1998;29(10):2189–2195.
207. Rosenberg GA, Navratil M, Barone F, Feuerstein G. Proteolytic cascade enzymes increase in focal cerebral ischemia in rat. *J. Cereb. Blood Flow Metab*. 1996;16(3):360–366.
208. Rosenberg GA, Navratil M. Metalloproteinase inhibition blocks edema in intracerebral hemorrhage in the rat. *Neurology*. 1997;48(4):921–926.
209. Rosenberg GA. Matrix metalloproteinases in brain injury. *J. Neurotrauma*. 1995;12(5):833–842.
210. Rupniak NM, Boyce S, Webb JK, u. a. Effects of the bradykinin B1 receptor antagonist des-Arg9[Leu8]bradykinin and genetic disruption of the B2 receptor on nociception in rats and mice. *Pain*. 1997;71(1):89–97.
211. Saed GM, Carretero OA, MacDonald RJ, Scicli AG. Kallikrein messenger RNA in rat arteries and veins. *Circ. Res*. 1990;67(2):510–516.
212. Sasaki T, Kassell NF, Zuccarello M, u. a. Barrier disruption in the major cerebral arteries during the acute stage after experimental subarachnoid hemorrhage. *Neurosurgery*. 1986;19(2):177–184.
213. Schievink WI. Intracranial aneurysms. *N. Engl. J. Med*. 1997;336(1):28–40.
214. Schilling L, Wahl M. Mediators of cerebral edema. *Adv. Exp. Med. Biol*. 1999;474:123–141.
215. Schmidt JM, Rincon F, Fernandez A, u. a. Cerebral infarction associated with acute subarachnoid hemorrhage. *Neurocrit Care*. 2007;7(1):10–17.
216. Schöller K, Trinkl A, Klopotoski M, u. a. Characterization of microvascular basal lamina damage and blood-brain barrier dysfunction following subarachnoid hemorrhage in rats. *Brain Res*. 2007;1142:237–246.
217. Schubert GA, Poli S, Schilling L, Heiland S, Thomé C. Hypothermia reduces cytotoxic edema and metabolic alterations during the acute phase of massive SAH: a diffusion-weighted imaging and spectroscopy study in rats. *J. Neurotrauma*. 2008;25(7):841–852.
218. Schwartz AY, Masago A, Sehba FA, Bederson JB. Experimental models of subarachnoid hemorrhage in the rat: a refinement of the endovascular filament model. *J. Neurosci. Methods*. 2000;96(2):161–167.

219. Schwartz TH, Solomon RA. Perimesencephalic nonaneurysmal subarachnoid hemorrhage: review of the literature. *Neurosurgery*. 1996;39(3):433–440.
220. Scicli AG, Forbes G, Nolly H, Dujovny M, Carretero OA. Kallikrein-kinins in the central nervous system. *Clin Exp Hypertens A*. 1984;6(10-11):1731–1738.
221. Sehba FA, Bederson JB. Mechanisms of acute brain injury after subarachnoid hemorrhage. *Neurol. Res*. 2006;28(4):381–398.
222. Sehba FA, Ding WH, Cheresnev I, Bederson JB. Effects of S-nitrosoglutathione on acute vasoconstriction and glutamate release after subarachnoid hemorrhage. *Stroke*. 1999;30(9):1955–1961.
223. Sehba FA, Mostafa G, Knopman J, Friedrich V, Bederson JB. Acute alterations in microvascular basal lamina after subarachnoid hemorrhage. *J. Neurosurg*. 2004;101(4):633–640.
224. Sehba FA, Pluta RM, Zhang JH. Metamorphosis of subarachnoid hemorrhage research: from delayed vasospasm to early brain injury. *Mol. Neurobiol*. 2011;43(1):27–40.
225. Sercombe R, Dinh YRT, Gomis P. Cerebrovascular inflammation following subarachnoid hemorrhage. *Jpn. J. Pharmacol*. 2002;88(3):227–249.
226. Shigemori Y, Katayama Y, Mori T, Maeda T, Kawamata T. Matrix metalloproteinase-9 is associated with blood-brain barrier opening and brain edema formation after cortical contusion in rats. *Acta Neurochir. Suppl*. 2006;96:130–133.
227. Simson JA, Chao J, Dom R, Chao L, Margolius HS. Kallikrein localization in rat brain by immunohistochemistry. *Adv. Exp. Med. Biol*. 1986;198 Pt B:129–133.
228. Simson JA, Dom R, Chao J, u. a. Immunocytochemical localization of tissue kallikrein in brain ventricular epithelium and hypothalamic cell bodies. *J. Histochem. Cytochem*. 1985;33(9):951–953.
229. Smith AL, Larson CP, Hoff JT. Effects of halothane on regional cerebral blood flow in experimental focal ischemia. *Anesthesiology*. 1973;39(4):377–381.
230. Smith SL, Scherch HM, Hall ED. Protective effects of tirilazad mesylate and metabolite U-89678 against blood-brain barrier damage after subarachnoid hemorrhage and lipid peroxidative neuronal injury. *J. Neurosurg*. 1996;84(2):229–233.
231. Solomon RA, Antunes JL, Chen RY, Bland L, Chien S. Decrease in cerebral blood flow in rats after experimental subarachnoid hemorrhage: a new animal model. *Stroke*. 1985;16(1):58–64.
232. Sternlicht MD, Werb Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol*. 2001;17:463–516.
233. Stoffel M, Berger S, Staub F, u. a. The effect of dietary alpha-tocopherol on the experimental vasogenic brain edema. *J. Neurotrauma*. 1997;14(5):339–348.
234. Stover JF, Dohse NK, Unterberg AW. Significant reduction in brain swelling by administration of nonpeptide kinin B2 receptor antagonist LF 16-0687Ms after controlled cortical impact injury in rats. *J. Neurosurg*. 2000;92(5):853–859.

235. Stummer W, Weber K, Tranmer B, Baethmann A, Kempfski O. Reduced mortality and brain damage after locomotor activity in gerbil forebrain ischemia. *Stroke*. 1994;25(9):1862–1869.
236. Suarez JI, Tarr RW, Selman WR. Aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *N. Engl. J. Med.* 2006;354(4):387–396.
237. Sugawara T, Fujimura M, Noshita N, u. a. Neuronal death/survival signaling pathways in cerebral ischemia. *NeuroRx*. 2004;1(1):17–25.
238. Suzuki H, Kanamaru K, Tsunoda H, u. a. Heme oxygenase-1 gene induction as an intrinsic regulation against delayed cerebral vasospasm in rats. *J. Clin. Invest.* 1999;104(1):59–66.
239. Teasdale G, Jennett B. Assessment and prognosis of coma after head injury. *Acta Neurochir (Wien)*. 1976;34(1-4):45–55.
240. Teasdale G, Jennett B. Assessment of coma and impaired consciousness. A practical scale. *Lancet*. 1974;2(7872):81–84.
241. Teasdale G, Jennett B. Assessment of coma and severity of brain damage. *Anesthesiology*. 1978;49(3):225–226.
242. Teasdale GM, Drake CG, Hunt W, u. a. A universal subarachnoid hemorrhage scale: report of a committee of the World Federation of Neurosurgical Societies. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1988;51(11):1457.
243. Thal SC, Mebmer K, Schmid-Elsaesser R, Zausinger S. Neurological impairment in rats after subarachnoid hemorrhage--a comparison of functional tests. *J. Neurol. Sci.* 2008;268(1-2):150–159.
244. Thal SC, Plesnila N. Non-invasive intraoperative monitoring of blood pressure and arterial pCO₂ during surgical anesthesia in mice. *J. Neurosci. Methods*. 2007;159(2):261–267.
245. Thal SC, Sporer S, Klopotoski M, u. a. Brain edema formation and neurological impairment after subarachnoid hemorrhage in rats. Laboratory investigation. *J. Neurosurg*. 2009;111(5):988–994.
247. Thal SC, Sporer S, Plesnila N, u. a. Evolution of brain edema after subarachnoid hemorrhage (SAH) in rats. *J Cereb Blood Flow Metab*. 0000;25(S1):S271.
248. Theodorsson-Norheim E. Friedman and Quade tests: BASIC computer program to perform nonparametric two-way analysis of variance and multiple comparisons on ranks of several related samples. *Comput. Biol. Med.* 1987;17(2):85–99.
249. Theodorsson-Norheim E. Kruskal-Wallis test: BASIC computer program to perform nonparametric one-way analysis of variance and multiple comparisons on ranks of several independent samples. *Comput Methods Programs Biomed*. 1986;23(1):57–62.
250. Török E, Klopotoski M, Trabold R, u. a. Mild hypothermia (33 degrees C) reduces intracranial hypertension and improves functional outcome after subarachnoid hemorrhage in rats. *Neurosurgery*. 2009;65(2):352–359.
251. Trabold R, Erös C, Zweckberger K, u. a. The role of bradykinin B(1) and B(2) receptors for secondary brain damage after traumatic brain injury in mice. *J. Cereb. Blood Flow Metab*.

2010;30(1):130–139.

253. Ueda H, Fujita R. Cell death mode switch from necrosis to apoptosis in brain. *Biol. Pharm. Bull.* 2004;27(7):950–955.

254. Uhl E, Lehmberg J, Steiger H-J, Messmer K. Intraoperative detection of early microvasospasm in patients with subarachnoid hemorrhage by using orthogonal polarization spectral imaging. *Neurosurgery.* 2003;52(6):1307–1315.

255. Unterberg A, Baethmann AJ. The kallikrein-kinin system as mediator in vasogenic brain edema. Part 1: Cerebral exposure to bradykinin and plasma. *J. Neurosurg.* 1984;61(1):87–96.

256. Unterberg A, Dautermann C, Baethmann A, Müller-Esterl W. The kallikrein-kinin system as mediator in vasogenic brain edema. Part 3: Inhibition of the kallikrein-kinin system in traumatic brain swelling. *J. Neurosurg.* 1986;64(2):269–276.

257. Varsos VG, Liszczak TM, Han DH, u. a. Delayed cerebral vasospasm is not reversible by aminophylline, nifedipine, or papaverine in a “two-hemorrhage” canine model. *Journal of Neurosurgery.* 1983;58(1):11–17.

258. Veelken JA, Laing RJ, Jakubowski J. The Sheffield model of subarachnoid hemorrhage in rats. *Stroke.* 1995;26(7):1279–1283.

259. Virtanen R, Savola JM, Saano V. Highly selective and specific antagonism of central and peripheral alpha 2-adrenoceptors by atipamezole. *Arch Int Pharmacodyn Ther.* 1989;297:190–204.

260. Voldby B, Enevoldsen EM. Intracranial pressure changes following aneurysm rupture. Part 1: clinical and angiographic correlations. *J. Neurosurg.* 1982;56(2):186–196.

261. Vos CM, Gartner S, Ransohoff RM, u. a. Matrix metalloproteinase-9 release from monocytes increases as a function of differentiation: implications for neuroinflammation and neurodegeneration. *J. Neuroimmunol.* 2000;109(2):221–227.

262. de Vries HE, Blom-Roosemalen MC, van Oosten M, u. a. The influence of cytokines on the integrity of the blood-brain barrier in vitro. *J. Neuroimmunol.* 1996;64(1):37–43.

263. Vu TH, Shipley JM, Bergers G, u. a. MMP-9/gelatinase B is a key regulator of growth plate angiogenesis and apoptosis of hypertrophic chondrocytes. *Cell.* 1998;93(3):411–422.

264. Wahl M, Unterberg A, Baethmann A, Schilling L. Mediators of blood-brain barrier dysfunction and formation of vasogenic brain edema. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 1988;8(5):621–634.

265. Wahl M, Unterberg A, Baethmann A, Schilling L. Mediators of vasogenic brain edema. *J Basic Clin Physiol Pharmacol.* 1990;1(1-4):221–233.

266. Wahl M, Whalley ET, Unterberg A, u. a. Vasomotor and permeability effects of bradykinin in the cerebral microcirculation. *Immunopharmacology.* 1996;33(1-3):257–263.

267. Wang X, Jung J, Asahi M, u. a. Effects of matrix metalloproteinase-9 gene knock-out on morphological and motor outcomes after traumatic brain injury. *J. Neurosci.* 2000;20(18):7037–7042.

268. Wang X, Jung J, Asahi M, et al. Effects of Matrix Metalloproteinase-9 Gene Knock-Out on Morphological and Motor Outcomes after Traumatic Brain Injury. *The Journal of Neuroscience*. 2000;20(18):7037–7042.
269. Warner MA, Nadler JV, Crain BJ. Effects of NMDA receptor antagonists and body temperature in the gerbil carotid occlusion model of transient forebrain ischemia. *Prog. Clin. Biol. Res.* 1990;361:409–414.
270. Watts RG, Wright JL, Atkinson LL, Merchant RE. Histopathological and blood-brain barrier changes in rats induced by an intracerebral injection of human recombinant interleukin 2. *Neurosurgery*. 1989;25(2):202–208.
271. Werb Z. ECM and cell surface proteolysis: regulating cellular ecology. *Cell*. 1997;91(4):439–442.
272. Whalley ET, Wahl M. Analysis of bradykinin receptor mediating relaxation of cat cerebral arteries in vivo and in vitro. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 1983;323(1):66–71.
273. Widenka DC, Medele RJ, Stummer W, Bise K, Steiger HJ. Inducible nitric oxide synthase: a possible key factor in the pathogenesis of chronic vasospasm after experimental subarachnoid hemorrhage. *J. Neurosurg.* 1999;90(6):1098–1104.
274. Wikipedia contributors. Hageman-Faktor. *Wikipedia*. 2012. <http://de.wikipedia.org/w/index.php?title=Hageman-Faktor&oldid=101640621>
275. Wood MJ, Nowitzke AM. Epidemiological aspects of spontaneous subarachnoid haemorrhage in Queensland, Australia. *J Clin Neurosci.* 2005;12(7):770–774.
276. Xia C-F, Yin H, Borlongan CV, Chao L, Chao J. Kallikrein gene transfer protects against ischemic stroke by promoting glial cell migration and inhibiting apoptosis. *Hypertension*. 2004;43(2):452–459.
277. Xia C-F, Yin H, Yao Y-Y, et al. Kallikrein protects against ischemic stroke by inhibiting apoptosis and inflammation and promoting angiogenesis and neurogenesis. *Hum. Gene Ther.* 2006;17(2):206–219.
278. Yong T, Linthicum DS. Microvascular leakage in mouse pial venules induced by bradykinin. *Brain Inj.* 1996;10(5):385–393.
279. Yong VW, Power C, Forsyth P, Edwards DR. Metalloproteinases in biology and pathology of the nervous system. *Nat. Rev. Neurosci.* 2001;2(7):502–511.
280. Yong VW, Power C, Forsyth P, Edwards DR. Metalloproteinases in biology and pathology of the nervous system. *Nat. Rev. Neurosci.* 2001;2(7):502–511.
281. Yong VW. Metalloproteinases: mediators of pathology and regeneration in the CNS. *Nat. Rev. Neurosci.* 2005;6(12):931–944.
282. Yurchenco PD, Schittny JC. Molecular architecture of basement membranes. *FASEB J.* 1990;4(6):1577–1590.
283. Zalewska T, Ziemka-Nalecz M, Sarnowska A, Domańska-Janik K. Transient forebrain

- ischemia modulates signal transduction from extracellular matrix in gerbil hippocampus. *Brain Res.* 2003;977(1):62–69.
284. Zalewska T, Ziemka-Nałecz M, Sarnowska A, Domańska-Janik K. Involvement of MMPs in delayed neuronal death after global ischemia. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*. 2002;62(2):53–61.
285. Zausinger S, Baethmann A, Schmid-Elsaesser R. Anesthetic methods in rats determine outcome after experimental focal cerebral ischemia: mechanical ventilation is required to obtain controlled experimental conditions. *Brain Res. Brain Res. Protoc.* 2002;9(2):112–121.
286. Zausinger S, Lumenta DB, Pruneau D, u. a. Effects of LF 16-0687 Ms, a bradykinin B(2) receptor antagonist, on brain edema formation and tissue damage in a rat model of temporary focal cerebral ischemia. *Brain Res.* 2002;950(1-2):268–278.
287. Zetterling M, Hallberg L, Ronne-Engström E. Early global brain oedema in relation to clinical admission parameters and outcome in patients with aneurysmal subarachnoid haemorrhage. *Acta Neurochir (Wien)*. 2010.
288. del Zoppo GJ, Hallenbeck JM. Advances in the vascular pathophysiology of ischemic stroke. *Thromb. Res.* 2000;98(3):73–81.

7 Danksagung

Diese Arbeit wurde im Institut für Chirurgische Forschung unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. med. Ulrich Pohl, in der Arbeitsgruppe Experimentelle Neurochirurgie unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. med. Nikolaus Plesnila angefertigt. Betreut wurde die Arbeit durch Herrn PD. Dr. med. Karsten Schöller.

Mein Dank gilt zuerst Herrn Prof. Dr. med. Nikolaus Plesnila für die Überlassung des Dissertationsthemas, die herzliche Aufnahme in die Arbeitsgruppe und die hervorragende Betreuung bei der Durchführung der Experimente sowie in allen wissenschaftlichen Fragen.

Die Arbeit wäre nicht ohne die Unterstützung meiner Mitdoktoranden möglich gewesen, die mir immer freundschaftlich und mit Rat und Tat zu Seite standen. Hier gilt mein Dank besonders Dr. med. Benjamin Friedrich und Sergej Feiler für die Einarbeitung in das SAB-Modell und die Hilfe bei Mess- und Operationstechniken.

Darüber hinaus möchte ich mich bei den technischen Assistentinnen, insbesondere bei Frau Uta Mamrak für die Verblindung der Versuchstiere und bei allen anderen Mitarbeitern des ICF bedanken.

Für die Unterstützung in IT Fragen danke ich Herrn W. Jansen.

Herrn Prof. Dr. med. Reinhard Oeckler danke ich für das geduldige Korrekturlesen und die vielen wertvollen Ratschläge.

Mein besonderer Dank gilt meiner Familie, die mich immerzu, in allen Lebenslagen und bei allen Entscheidungen liebevoll und tatkräftig unterstützt haben.

8 Bisher veröffentlichte Teilaspekte der Arbeit

„Contribution of bradykinin receptors to the development of secondary brain damage after experimental subarachnoid hemorrhage, Neurosurgery. 2011 Apr;68(4):1118-23

Schöller K., Feiler S., Anetsberger S., Kim S., Plesnila N.

Eidesstattliche Versicherung

Anetsberger, Stephanie

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

Die Bedeutung sowohl von Bradykinin B1 und B2 Rezeptoren als auch von Matrix Metalloproteinase-9 für die Entstehung des sekundären Hirnschadens nach experimenteller Subarachnoidalblutung in der Maus

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Ort, Datum

Unterschrift Doktorandin/Doktorand