

**Aus der Neurochirurgischen Klinik und Poliklinik
der Universität Würzburg**

Direktor: Professor Dr. med. Ralf-Ingo Ernestus

Therapie des Hirnschadens nach Neurotrauma mit dem humanen

C1-Inhibitor Berinert

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Irmak Salur

aus

Bonn

Würzburg, Januar 2018

Referentin: Prof. Dr. med. Anna Leena Sirén

Korreferentin: Prof. Dr. med. Nurcan Üçeyler

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Stefan Störk

Dekan: Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 06.12.2018

Die Promovendin ist Ärztin

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung.....	1
1.1 Schädel-Hirn-Trauma: Definition, Inzidenz und Pathophysiologie.....	1
1.2 Das posttraumatische Hirnödem.....	3
1.2.1 Das vasogene Hirnödem.....	4
1.2.2 Das zytotoxische Hirnödem.....	6
1.3 Neuroinflammation.....	8
1.4 Das Kallikrein-Kinin-System.....	10
1.5 Fragestellung der Arbeit.....	14
2 Material und Methoden.....	15
2.1 Material.....	15
2.1.1 Verbrauchsmaterialien.....	15
2.1.2 Geräte.....	16
2.1.3 Puffer und Lösungen.....	17
2.1.4 Reagenzien und Antikörper.....	19
2.2 Methoden.....	21
2.2.1 Kälteläsionen.....	21
2.2.1.1 Versuchstiere.....	21
2.2.1.2 Narkose.....	21
2.2.1.3 Induktion fokaler Kälteläsionen.....	22
2.2.1.4 Posttraumatische Phase.....	28
2.2.1.5 Hirnentnahme.....	28
2.2.2 Bestimmung des Läsionsvolumens.....	28
2.2.3 Ermittlung des Hirnödems.....	29
2.2.4 Western Blotting zum Nachweis der Thrombusbildung und Bestimmung der BHS-Störung.....	31
2.2.4.1 Probenaufbereitung.....	31
2.2.4.2 Proteinquantifizierung.....	31
2.2.4.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	33
2.2.4.4 Semi-Dry-Blotting.....	34
2.2.5 Histologie und Immunhistochemie.....	35
3 Statistische Auswertung.....	37

4 Ergebnisse.....	38
4.1 Läsionsvolumen nach Behandlung mit C1-Inhibitor.....	38
4.2 C1-Inhibitor reduziert das vasogene Hirnödem nach Trauma.....	40
4.3 Antiinflammatorischer Effekt des C1-Inhibitors.....	42
4.4 Antithrombotischer Effekt des C1-Inhibitors.....	45
5 Diskussion.....	48
5.1 Methodische Überlegungen.....	48
5.2 Diskussion der Ergebnisse.....	50
6 Zusammenfassung.....	53
7 Literaturverzeichnis.....	54
8 Abbildungsverzeichnis.....	68

1 Einleitung

1.1 Schädel-Hirn-Trauma: Definition, Inzidenz und Pathophysiologie

Das Schädel-Hirn-Trauma (SHT) entsteht durch eine äußere Gewalteinwirkung auf den Schädel und/oder das Gehirn. Hierbei unterscheidet man abhängig vom klinischen Zustand des Patienten, der durch die Glasgow Coma Scale (GCS) abgebildet wird, zwischen einem leichten (GCS 15-13), mittelschweren (GCS 12-9) und schweren SHT (GCS 8-3) sowie abhängig von Verletzungsfolgen, zwischen einem gedeckten und offenen SHT. Das offene SHT geht mit einer Perforation der Kopfhaut, des Schädelknochens sowie der Dura mater einher (Firsching et al., 2015, Teasdale et al., 2014).

Europaweit erleiden pro Jahr ca. 2,5 Millionen Menschen ein SHT verschiedener Schweregrade (Maas et al., 2014). In Deutschland beträgt die Zahl der registrierten Fälle etwa 330 von 100.000 Einwohnern mit etwa 2750 Todesfällen pro Jahr (Rickels et al., 2010).

Das SHT wird bei 20- bis 45-Jährigen v.a. durch Sport- oder Verkehrsunfälle und bei älteren Menschen durch Sturzereignisse verursacht (Peeters et al., 2015). Menschen, die ein schweres SHT überleben, können unter bleibenden massiven Behinderungen leiden, aber auch ein mittelschweres oder leichtes SHT kann die Lebensqualität eines Menschen nachhaltig und langfristig beeinträchtigen. Das SHT verursacht enorme direkte und indirekte Kosten; allein durch Arbeitsausfall werden in Deutschland Kosten von hochgerechnet 2,5 Milliarden Euro jährlich verursacht (Rickels et al., 2010). Im letzten Jahrzehnt erkannte man zudem, dass das SHT chronisch fortschreitende neurodegenerative Prozesse wie z.B. dementielle Erkrankungen auslösen kann (Johnson et al., 2010; Wilson et al., 2017). Das SHT stellt also ein großes sozioökonomisches Problem dar. Trotz stetiger Bemühungen, diagnostische und therapeutische Maßnahmen zu verbessern, sind die Therapieoptionen des SHT limitiert (Stochetti et al., 2017; Hawryluk und Bullock, 2016).

Die klinische Prognose des SHT wird durch die traumabedingt entstandenen primären und sekundären Hirnschäden bestimmt. Der primäre Hirnschaden entsteht im Augenblick der Gewalteinwirkung, ist irreversibel und therapeutisch nicht zu beeinflussen. Er dient als Ausgangspunkt für die sekundären Hirnschäden. Zu den Primärschäden zählen Kontusion, fokale oder diffuse Blutung sowie diffuse axonale Schädigung (Blennow et al., 2012; Shlosberg et al., 2010; Hill et al., 2016).

Der sekundäre Hirnschaden wird durch verschiedene Pathomechanismen, die nach Trauma in Gang gesetzt werden und zu einer fortschreitenden funktionellen und strukturellen Zellschädigung führen, bewirkt. Hierzu zählen zytotoxisches und vasogenes Hirnödem, Ischämie, Inflammation und Thrombusbildung (Unterberg et al., 2004; Donkin und Vink 2010; Shlosberg et al., 2010; Schwarzmaier und Plesnila, 2014). Des Weiteren entsteht der sekundäre Hirnschaden durch extrakranielle Ursachen, die häufig als klinische Komplikationen bei Schädel-Hirn-Verletzten auftreten, wie Hypoxie oder systemische arterielle Hypotension (Firsching et al., 2015; Stochetti et al., 2017).

Da der primäre Hirnschaden irreversibel und kaum beeinflussbar ist, versuchen verschiedene Therapieansätze des SHT in die Pathomechanismen einzugreifen, um vor sekundären Hirnschäden zu schützen bzw. eine fortschreitende Zellschädigung auf ein Minimum zu reduzieren (Hill et al., 2016; Hawryluk und Bullock, 2016).

Diese durch den Primärschaden in Gang gesetzten Kaskaden bewirken eine unkontrollierte Freisetzung von Mediatorsubstanzen wie z.B. proinflammatorischen Zytokinen, freien Radikalen, exzitatorischen Aminosäuren (wie z.B. Glutamat), Stickstoffmonoxid oder Arachidonsäure. Es kommt zur Schädigung der Blut-Hirn-Schranke (BHS), Infiltration mit inflammatorischen Zellen (Makrophagen, Neutrophile etc.) sowie der Aktivierung der Komplementkaskade (Blennow et al., 2012; Shlosberg et al., 2010; Simon et al.,

2016). Der dadurch entstehende Sekundärschaden kann durch systemische arterielle Hypotension und Hypoxie zusätzlich verstärkt werden. Diese frühen pathologischen Prozesse können weiter fortschreiten und akute Komplikationen wie intrakraniellen Druckanstieg, Ischämie, Epilepsie und letztendlich Tod verursachen. Parallel dazu entwickeln sich langsam fortschreitende pathophysiologische Mechanismen wie Neovaskularisation, Transformation und Dysfunktion von Astrozyten und Veränderungen von synaptischen Verbindungen. Dies begünstigt so die Entstehung von Epilepsie und psychiatrischen sowie neurodegenerativen Erkrankungen wie z.B. Alzheimer-Demenz (Blennow et al., 2012; Wilson et al., 2017; Johnson et al., 2010;)

1.2 Das posttraumatische Hirnödem

Die pathophysiologischen Mechanismen, welche nach einem SHT ablaufen, resultieren häufig in der Bildung eines Hirnödems, welches aus einer vasogenen und einer zytotoxischen Komponente besteht und einen raumfordernden Effekt auf das umgebende gesunde Hirngewebe ausübt (Donkin und Vink, 2010). Da das posttraumatische Hirnödem wesentlich die Mortalität und Morbidität der SHT-Patienten beeinflusst, ist es wichtig, die dem zugrundeliegenden Pathomechanismen zu verstehen.

Der raumfordernde Effekt des posttraumatischen Hirnödems führt zu einer Beeinträchtigung der Gewebsperfusion und somit der Sauerstoffversorgung. Dadurch bedingt kommt es zu einer Ischämie mit Zerstörung zellulärer Mechanismen wie transzellulärer Ionenpumpen (z.B. ATP-abhängige Na⁺/K⁺-Ionenpumpe) durch Sauerstoff- und Energiemangel (Salehi et al., 2017). Das dadurch resultierende zytotoxische Hirnödem führt zu einer weiteren Zunahme des Läsionsvolumens, was wiederum den raumfordernden Effekt des vasogenen Ödems verstärkt („Circulus vitiosus“) (Marmarou et al., 2006; Donkin und Vink, 2010). Durch anatomische Begrenzungen wie der Schädelknochen

kann sich das ödematöse Gehirn nicht weiter ausdehnen und es kommt zu einem Anstieg des intrakraniellen Drucks und so letztendlich zu einer Mittellinienverlagerung und Herniation des Gehirns mit Koma bzw. Tod des Patienten. Ein intrakranieller Druckanstieg wird ebenso bei traumatisch bedingten intrakraniellen Blutungen mit Einklemmungsgefahr beobachtet (Firsching et al., 2015; Stocchetti et al., 2017).

Die Monro-Kellie-Doktrin besagt, dass die Schädelhöhle als ein „starres Behältnis“ („*rigid box*“) ein definiertes Volumen (1600 ml) innehat und aus 3 Komponenten besteht: Hirngewebe (80 %), Blut (12 %), Liquor (8 %). Um den intrakraniellen Druck konstant zu halten, muss deren Summe immer gleichbleiben:

$$V (\text{gesamt}) = V (\text{Hirngewebe}) + V (\text{Blut}) + V (\text{Liquor})$$

Die Zunahme einer Komponente bzw. eine zusätzliche intrakranielle Raumforderung bedingt die Abnahme der anderen beiden Komponenten, damit das Gesamtvolumen konstant bleibt. Falls dies nicht möglich ist, steigt der intrakranielle Druck mit Gefahr einer Einklemmung (Mokri, B., 2001; Kinoshita, K., 2016).

Im Folgenden soll eine Erläuterung sekundärer Hirnschäden mit Verdeutlichung der ablaufenden pathophysiologischen Prozesse stattfinden.

1.2.1 Das vasogene Hirnödem

Das SHT führt vorwiegend zum vasogenen Hirnödem (Donkin und Vink, 2010). Ursächlich für die Entstehung des vasogenen Hirnödems ist eine Störung der BHS. Die BHS ist eine hochselektive Barriere zwischen dem Hirnparenchym und dem Blutstrom. Sie dient dazu, die besondere Homöostase des Nervengewebes aufrechtzuerhalten und regelt den parazellulären Stoff-

austausch. Wesentliche Bestandteile dieser Barriere sind kapilläre Endothelzellen, die über *tight junctions* eng miteinander verknüpft sind. Typische *tight junction*-Proteine sind Occludin und Claudin-5 (Obermeier et al., 2013). Die Endothelzellen sind eng mit Perizyten und Astrozyten verbunden (s. Abb. 1).

Durch verschiedene pathologische Prozesse wie exzessive Vasodilatation, hypertensive Krise oder Schlaganfall kann es zu einer Störung der BHS kommen, indem die *tight junctions* geöffnet werden und die Gefäßpermeabilität dadurch steigt. Das führt zum Austritt der intravasalen Flüssigkeit in den Extrazellulärraum mit dem Resultat eines vasogenen Ödems (Obermeier et al., 2013, Donkin und Vink, 2010; Chodobski et al., 2011).

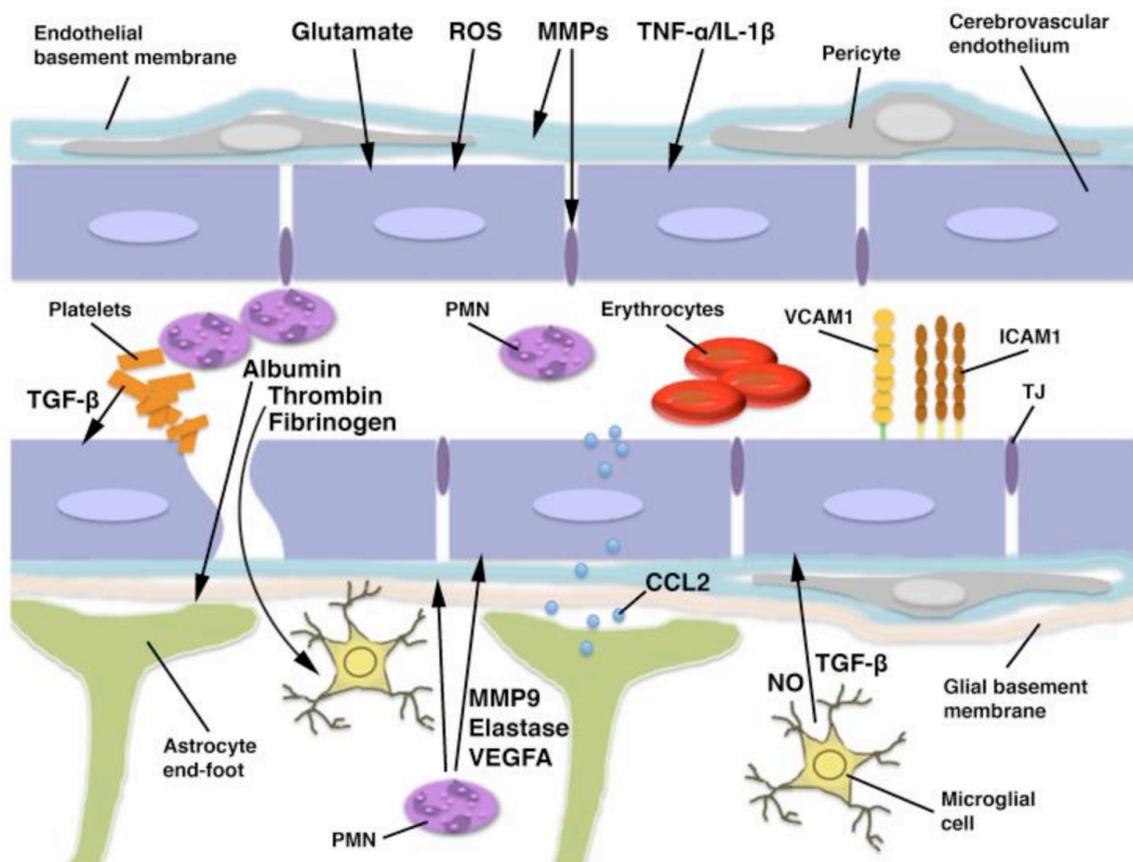


Abb. 1: Schematische Darstellung der BHS und neurovaskulären Einheit im geschädigten Hirngewebe (aus Chodobski et al., 2011. Die schriftliche Druckerlaubnis wurde eingeholt).

CCL2: CC-Chemokin-Ligand 2; ICAM1: Interzelluläres Zelladhäsionsmolekül 1; IL-1 β : Interleukin-1 β ; MMP: Matrix-Metalloproteasen; NO: Stickstoffmonoxid; PMN: polymorphkerniger Leukozyt; ROS: reaktive Sauerstoffspezies; TGF- β : Tumorstrompfaktor β ; TJ: *tight junction*; TNF- α : Tumornekrosefaktor- α ; VCAM1: *Vascular Cell Adhesion Molecule 1*; VEGFA: *Vascular Endothelial Growth Factor A*.

1.2.2 Das zytotoxische Hirnödern

Bei einem zytotoxischen Hirnödern kommt es zu einer intrazellulären Flüssigkeitsansammlung (Donkin und Vink 2010). Das SHT führt zu Veränderungen des zerebralen Blutflusses mit Dysfunktion der zerebrovaskulären Autoregulation und des zellulären Metabolismus und

dadurch bedingt einer inadäquaten Sauerstoffversorgung des Hirngewebes. Durch Hypoxie und die durch den oxidativen Stress entstandenen freien Radikale kommt es zum Versagen der membrangebundenen Na^+/K^+ -ATPase und damit zur Störung des zellulären Elektrolytgleichgewichts mit Natrium- und Wassereinstrom in den intrazellulären Raum sowie Akkumulation von Kaliumionen extrazellulär. Des Weiteren kommt es zu einer exzessiven Freisetzung von exzitatorischen Aminosäuren wie Glutamat, was durch Öffnung von spannungsabhängigen Ca^{2+} - und Na^+ -Kanälen zu einem konsekutiven Calcium- und Natriumeinstrom in den intrazellulären Raum mit Folge eines apoptotischen bzw. nekrotischen Zelltodes führt (s. Abb. 2)

An der Entstehung des zytotoxischen Ödems sind maßgeblich Astrozyten beteiligt, die direkt mit der BHS interagieren. Im „*Controlled cortical impact*“-Tiermodell konnte man bereits 2-4 Stunden nach SHT histologische Merkmale eines zytotoxischen Ödems beobachten (Chodobski et al., 2011).

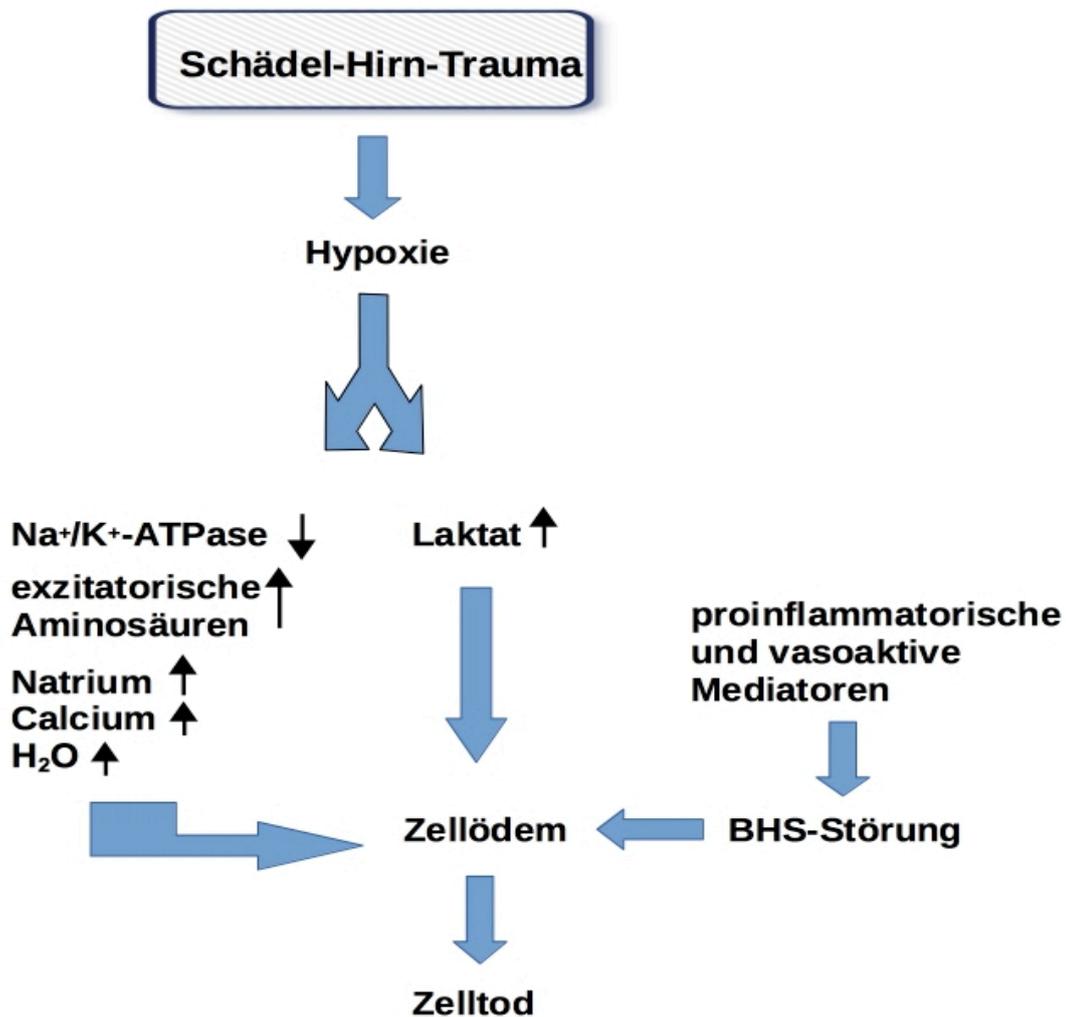


Abb. 2: Darstellung sekundärer Hirnschäden nach SHT (nach Raslan et al., 2012)

Na⁺/K⁺-ATPase: Natrium/Kalium-Adenosintriphosphatase

1.3 Neuroinflammation

Inflammatorische Prozesse tragen erheblich zum Sekundärschaden bei (Simon et al., 2016; Cederberg und Siesjö, 2010). Eine zentrale Rolle dabei spielen inflammatorische Mediatoren wie z.B. Interleukine. Diese bewirken die Rekrutierung von Entzündungszellen (Makrophagen, neutrophile Granulozyten) in das Läsionsareal und Mikroglia-Aktivierung (Simon et al., 2016;

Schwarzmeier und Plesnila, 2014). Nach einer Hirnverletzung sind sowohl eingewanderte Entzündungszellen als auch Mikroglia, Oligodendrozyten, Astrozyten und Neurone in der Lage, inflammatorische Mediatoren zu produzieren (Simon et al., 2016; Schwarzmaier und Plesnila, 2014; Albert-Weißberger et al., 2013).

1.4 Das Kallikrein-Kinin-System

Das Kallikrein-Kinin-System ist ein physiologisches Regelsystem, das nach Gewebsverletzung eine wichtige regulatorische Rolle bei Vasodilatation, Gefäßpermeabilität, Ödembildung, Entzündung, Migration von inflammatorischen Zellen sowie Schmerzvermittlung spielt (Leeb-Lundberg et al., 2005; Marceau und Regoli, 2004).

Dieses System kann zum einen im Plasma und zum anderen im Gewebe ablaufen. Im Plasma wird das System durch aktivierten FXII (FXIIa) initiiert, welches Präkallikrein spaltet und so Plasmakallikrein freisetzt. Plasmakallikrein wiederum setzt das Bradykinin aus seiner inaktiven Vorstufe, dem Kininogen frei. Im Gewebe läuft diese Kaskade ähnlich ab, jedoch mit wichtigen Unterschieden: Statt durch FXIIa wird das System durch andere Serinproteasen initiiert und das freigesetzte Kinin ist Kallidin und nicht Bradykinin. Die Kinine vermitteln ihre Effekte durch Bindung an zwei G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR), dem Kininrezeptor B1 und B2 (für eine Übersicht siehe Albert-Weissenberger et al., 2013). Es wurde nachgewiesen, dass alle Komponenten des Kontakt-Kinin-Systems im Hirn vorhanden sind und dieses System nach Hirnverletzungen aktiviert wird. Nach einer Hirnverletzung, wie Schlaganfall oder SHT, trägt dieses System zu einer Ausweitung des Hirnschadens bei (Albert-Weissenberger et al., 2014, 2013). Ein direkter Zusammenhang zwischen der Ausschüttung des Bradykinins nach einer traumatischen Hirnverletzung und der Ausbildung eines Hirnödems wurde von Arbeitsgruppen des Klinikums der Universität München an Patienten belegt (Kunz et al., 2013). Das Kallikrein-Kinin-System kann kaum isoliert betrachtet werden, da wichtige Vernetzungen zu anderen biologischen Systemen bestehen, beispielsweise über FXIIa zur intrinsischen Gerinnung und der Kininase II zum Renin-Angiotensin-System (s. Abb. 3). Dass dies eine Rolle nach Hirnverletzungen spielt, zeigt auch die Forschung der letzten Jahre. So wurde gezeigt, dass eine Plasmakallikrein-Defizienz bei experimentellem Schlaganfall eine Ausweitung des Gewebeschadens und die damit funktionellen

Defizite vermindert. Zum einen verhindert die Plasmakallikrein-Defizienz die Bradykinin-Ausschüttung, zum anderen läuft die intrinsische Gerinnung nur eingeschränkt ab (FXII kann durch Plasmakallikrein aktiviert werden). Gemeinsam bewirkt dies eine verminderte Ausweitung des Gewebes Schadens und führt zu einem besseren funktionellen Outcome (Göb et al., 2015). Nach experimentellem SHT führt eine Hemmung des FXIIa (genauso wie eine Defizienz des FXII) zu einem geringeren Gewebes Schaden. Auch hier wird vermutet, dass dies sowohl über die Hemmung der Bradykinin-vermittelten Effekte als auch über die Hemmung der intrinsischen Gerinnung geschieht (Hopp et al., 2016, 2017).

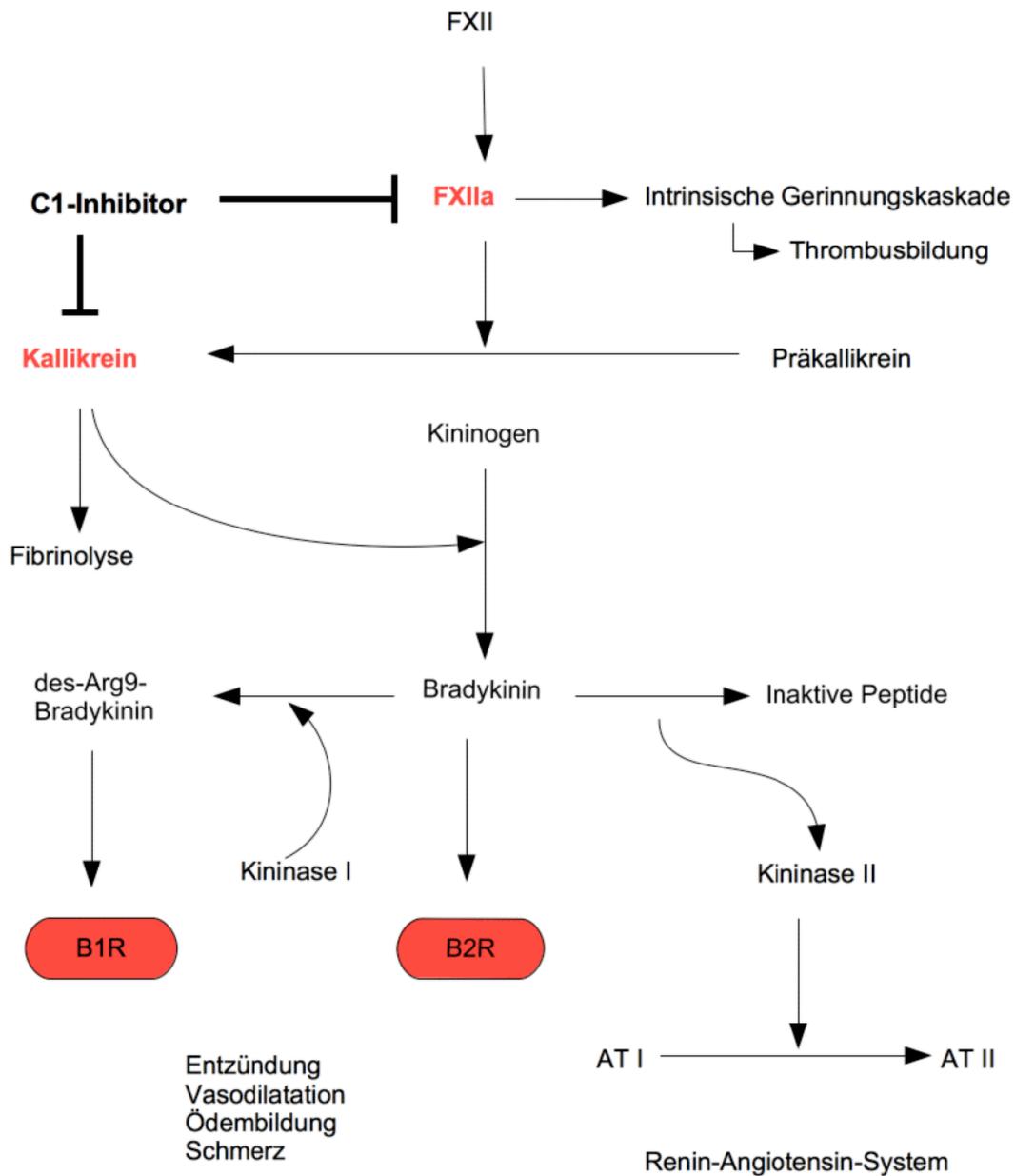


Abb. 3: Darstellung des Kontakt-Kinin-Systems mit Blockade des FXIIa und Plasma-Kallikrein durch C1-Inhibitor und somit Inhibition der intrinsischen Gerinnungskaskade sowie des Kallikrein-Kinin-Systems (nach Albert-Weissenberger et al., 2014)

AT I: Angiotensin I; AT II: Angiotensin II; B1R: Bradykinin-Rezeptor 1; B2R: Bradykinin-Rezeptor 2; FXII: Gerinnungsfaktor XII; FXIIa: aktivierter FXII.

Im Plasma ist der C1-Inhibitor der wichtigste Inhibitor des Kallikrein-Kinin-Systems (Caliezi et al., 2000). Es handelt sich dabei um ein 478 Aminosäuren großes Protein, das zur Familie der Serpine gezählt wird. Als Serinprotease-Inhibitor hemmt er unter anderem die Aktivität des FXIIa und des Plasmakallikreins. Des Weiteren ist bekannt, dass der C1-Inhibitor die initiale Aktivierung des Komplement-Systems und dessen Auswirkungen hemmt (Schoenfeld et al., 2016). Außerdem scheint der C1-Inhibitor auch unabhängig von seiner Aktivität als Serinprotease-Inhibitor biologische Effekte zu besitzen. So wurde beispielsweise berichtet, dass er über Bindung an E- and P-Selektinen auf Endothelzellen die Transmigration von Leukozyten verhindern könne (Cai et al., 2005; Cai und Davis, 2003). Nach experimentellem Schlaganfall bewirkt eine therapeutische Behandlung mit 15 IU C1-Inhibitor 1 Stunde nach Reperfusion eine deutliche Reduktion des Infarktolumens (Heydenreich et al., 2012). Der Einfluss einer therapeutischen Behandlung mit dem C1-Inhibitor wurde in einem SHT-Mausmodell, dem sogenannten „*Controlled cortical impact*“-Modell untersucht. Die Studien zeigen, dass sowohl eine Behandlung mit 15 IU C1-Inhibitor 10 Min. als auch 1 Stunde nach Hirntrauma die Schäden vermindert. Die therapeutische Behandlung 10 Min. nach Hirnschädigung führte in den Mäusen zu weniger motorischen und kognitiven Beeinträchtigungen und einem geringeren Läsionvolumen. Eine Behandlung 1 Stunde nach Hirnschädigung führte lediglich zu weniger motorischen Beeinträchtigungen (Longhi et al., 2008, 2009). Aus translationaler Sicht ist der C1-Inhibitor sehr interessant, da er bereits für die Behandlung von Patienten mit hereditärem Angioödem zugelassen ist.

1.5 Fragestellung der Arbeit

Vorangegangene Studien belegten, dass das Kontakt-Kinin-System entscheidend zur Ausprägung des posttraumatischen Hirnschadens beiträgt. Der C1-Inhibitor inhibiert das Kontakt-Kinin-System auf verschiedenen Ebenen (s. Abb. 3). Daher wird in der vorliegenden Arbeit überprüft, ob die therapeutische Anwendung eines C1-Inhibitors nach experimentellem SHT die Ausbildung eines Hirnödems, neuroinflammatorische Prozesse oder die zerebrale Thrombusbildung in der Mikrovaskulatur verringert und dadurch den traumatischen Hirnschaden reduziert

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Verbrauchsmaterialien

Materialien	Hersteller
Pipetten 20-100-200-1000 µl	Eppendorf
Einmal-Pipetten 5 ml-10 ml	Cellstar, Greiner Bio-One
Glaspipetten 5-10-20 ml	Brand
Transferpipetten	Sarstedt
Pipettenspitzen	Sarstedt
Falcon-Tubes 15-50 ml	Greiner Bio-One
96-Well-Spitzbodenplatte	Nunc®
Nahtmaterial-Prolene 5-0, monofil	Ethicon
Kompressen	NOBA Verbandmittel
Objekträger- Superfrost® Plus	R.Langenbrinck
Deckgläser	R.Langenbrinck
Aufbewahrungsdosen	Fa. Hartenstein
Whatmann-Papier	GE Healthcare Life Sciences
PVDF-Membran	Fa. Hartenstein
Röntgenfilm, Medical X-ray	Fujifilm Super RX

2.1.2 Geräte

Name	Hersteller
Stereotaxie-Gerät	TSE Systems GmbH
Feinwaage	Kern&Sohn GmbH, Denver Instrument
Schüttler: Heidolph	Polymax 1040
Rührer: Heidolph	MR 3001K
Heizblock: Thermomixer comfort	Eppendorf
Vortex	Scientific Industries
Vertikal-Gelelektrophorese-System: Mini- PROTEAN Tetra System	Bio Rad GmbH
Mini Trans-Blot Cell	Bio Rad GmbH
Brutschrank	Fa. Memmert
Entwicklermaschine: AGFA Curix 60	Healthcare
Fluorometer: Fluoroskan Ascent	Thermo Scientific
Zentrifuge: Centrifuge 5415-R	Eppendorf
Kryostat	Leica
Spectrophotometer: Multiskan plus Version 2.01	Labsystems
Scanner	Epson Perfection 3200

2.1.3 Puffer und Lösungen

eingesetzt bei	Name	Zusammensetzung
SDS-PAGE	RIPA-Puffer	1,25 ml 1 M Tris pH 7,41,5 ml 5 M NaCl 0,5 ml 100 % NP-40 0,5 ml 10 % SDS ad 50 ml Aqua dest.
SDS-PAGE	Proteaseinhibitormix	1,92 ml RIPA-Puffer 80 µl 20x Proteaseinhibitor- Stocklösung
SDS-PAGE	Stocklösung	1 Proteaseinhibitortablette gelöst in 2 ml RIPA-Puffer
SDS-PAGE	10x Laufpuffer	10 g SDS 30,3 g Tris 144,1 g Glycin ad 1000 ml Aqua dest.
SDS-PAGE	2x Probenpuffer	1,45 g 120 mM Tris (pH 6,8) 10 g 10 % SDS 20 ml 20 % Glycerin ad 75 ml Aqua dest. 20 ml 20 % β-Mercaptoethanol Spatelspitze Bromphenolblau ad 100 ml Aqua dest.
SDS-PAGE	Trenngel 10 %	4 ml H ₂ O 3,3 ml 30 % Acryl/Bisacrylamid 2,5 ml 1,5 M Tris pH 8,8 0,1 ml 10 % SDS

		0,1 ml 10 % APS 0,004 ml TEMED
	Trenngel 15 %	2,3 ml H ₂ O 5 ml 30 % Acryl/Bisacrylamid 2,5 ml 1,5 M Tris pH 8,8 0,1 ml 10 % SDS 0,1 ml 10 % APS 0,004 ml TEMED
SDS-PAGE	Sammelgel	5,5 ml H ₂ O 1,3 ml 30 % Acryl/Bisacrylamid 1 ml 1,5 M Tris pH 6,8 0,08 ml 10 % SDS 0,08 ml 10 % APS 0,008 ml TEMED
SDS-PAGE	10x Blottingpuffer	144 g Glycin 30,3 g Tris ad 1000 ml Aqua dest.
	1x Blottingpuffer	100 ml 10x Blottingpuffer 200 ml Methanol 700 ml Aqua dest.
SDS-PAGE	10x Waschpuffer	1L 10x PBS 5 ml 0,05 % Tween®
SDS-PAGE	Blockpuffer	5 g 5 % Milchpulver in 100 ml Waschpuffer gelöst
Hämalaun-Eosin-Färbung	Hämalaun nach Mayer	1 g Hämatoxylin 0,2 g NaJO ₃ 50 g Kaliumaluminiumsulfat (Kalialaun)

		50 g Chloralhydrat 1 g Zitronensäure in 1000 ml Aqua dest.
--	--	--

2.1.4 Reagenzien und Antikörper

Name	Hersteller; Bestellnummer; eingesetzte Verdünnung
C1-Inhibitor (Berinert)	CSL Behring GmbH
2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC)	Sigma-Aldrich
Evans-Blau	Sigma-Aldrich
Proteaseinhibitormix	Roche; 11697498001
BCA-Reagenz A: Bicinchoninsäure-Lösung	Thermo Scientific, LJ151423
BCA-Reagenz B: Kupfer(II)-sulfat-Lösung	Thermo Scientific, J1151264
AK polyklonal Kaninchen anti Fibrin(ogen)	1: 10000 Acris Antibodies; AP00766PU-N
AK monoklonal Maus anti Actin, Klon AC-15	1:500000 Sigma-Aldrich; A5441
AK monoklonal Maus anti Claudin 5	1:1000 Invitrogen; 35-2500
AK polyklonal Kaninchen anti Occludin	1:5000 Abcam; ab31721
AK polyklonal Esel anti Kaninchen gekoppelt mit HRPO	Dianova/Jackson; 711-035-152
AK polyklonal Esel anti Maus gekoppelt mit HRPO	Dianova/Jackson; 715-035-150

AK monoklonal Ratte anti Maus Neutrophil	Serotec; MCA771GA; 1:1000
AK polyklonal anti Ratte IgG biotinyliert	Vector; BA-4001; 1:100
AB-Komplex (Avidin-Biotin-Enzymkomplex)	Dako; 0492
<i>Western</i> Lightning Plus-ECL	Perkin Elmer, Inc.
Tween®20	Sigma; P1379-500ml
TEMED (Tetramethylethylenediamine)	Sigma; T9281-100ML
APS (Ammoniumperoxiddisulfat)	Merck; 1012010500
β-Mercaptoethanol	Merck; 444203-250ML
Tris (hydroxymethyl) aminomethan (M=121,14 g/ml)	Merck; 1.08382.2500
Rotiphorese®Gel 30 (Acrylamid)	Roth; 3029.1
Nonidet™ P40 Substitute (für RIPA-Puffer)	Sigma; 74385-1L
1 % Eosin-Lösung	Merck; 1.15935
Hämatoxylin	Sigma; H-9627
NaJO ₃	Fluka; 71702
Kaliumaluminiumsulfat (Kalialaun)	Merck; 1047
Chloralhydrat	Merck; 1.02425
Zitronensäure	Sigma; 33114
DAB (Diaminobenzidin)	Vector; SK-4100
Ketanest-S	Pfizer
Rompun®	Bayer
Isofluran	CP Pharma; 798-932

2.2 Methoden

2.2.1 Kälteläsionen

Die tierexperimentellen Methoden wurden von entsprechend geschulten Personen durchgeführt.

2.2.1.1 Versuchstiere

Als Versuchstiere wurden 96 männliche Mäuse aus dem Stamm C57Bl/6 verwendet, die ca. 6 Wochen alt waren und ein Gewicht zwischen 18-21 g aufwiesen. Alle Tiere wurden von Charles River bezogen. Die Untersuchungen wurden von 2012 bis 2013 an der Neurochirurgischen und der Neurologischen Klinik der Universität Würzburg mit Genehmigung der Regierung von Unterfranken durchgeführt (Aktenzeichen: 55.2-2531.01-3/09, -40/13).

Zur Untersuchung der Fragestellung wurde den Mäusen eine Stunde nach der Kälteläsion 15 IU oder 7,5 IU C1-Inhibitor intravenös appliziert. Eine entsprechende Menge an Vehikel wurde den Kontrollgruppen ebenfalls i.v. verabreicht.

Die Tiere wurden vor und nach den Versuchen bei Raumtemperatur mit freiem Zugang zu Nahrung und Wasser in Käfigen untergebracht.

2.2.1.2 Narkose

Die Narkose der Versuchstiere erfolgte durch eine intraperitoneale Injektion von S-Ketamin 25 mg/ml (Ketanest-S) und 2 % Xylazin (Rompun®) in einer Dosierung von 0,1 mg/g Körpergewicht (KG) S-Ketamin und 0,005 mg/g KG Xylazin.

2.2.1.3 Induktion fokaler Kälteläsionen

Das Kälteläsionsmodell zur Induktion einer fokalen Parenchymnekrose, das wir in unserem Experiment angewandt haben, wurde bereits in 1958 von Klatzo in der Katze beschrieben (Klatzo et al., 1958) und als einfaches und standardisiertes SHT-Mausmodell in der Arbeitsgruppe etabliert (Raslan et al., 2010, 2012; Mencl et al., 2014; Hopp et al., 2017). Hierbei wird mit einem Kältestempel eine fokale, gut umschriebene und in Größe und Lokalisation reproduzierbare Läsion auf die Schädelkalotte gesetzt, die zu einer Hirngewebsschädigung im darunterliegenden Kortex führt. Die Kälteapplikation wird in definierter Zeit und Temperatur durchgeführt. Nach Entfernung der Kältesonde kommt es durch Wiedererwärmung des Hirngewebes zu einer Schädigung von Nerven-, Glia- und Endothelzellen (Meryman et al., 1956; Raslan et al., 2010). Durch den primären Hirnschaden entsteht bereits eine Störung der BHS, welche zu einem vasogenen Ödem und damit verbunden zu inflammatorischen Prozessen führt.

Im Folgenden wird der Versuchsablauf im Detail beschrieben:

Nach Narkose des Versuchstiers wird der Kopf in einer stereotaktischen Halterung fixiert (s. Abb. 4), die Kopfhaut entlang der Mittellinie inzidiert und stumpf nach lateral präpariert (s. Abb. 5). Die Läsionsstelle befindet sich 1,5 mm rechts lateral sowie 1,5 mm kaudal des *Bregmas* am *Os parietale* (s. Abb. 6).

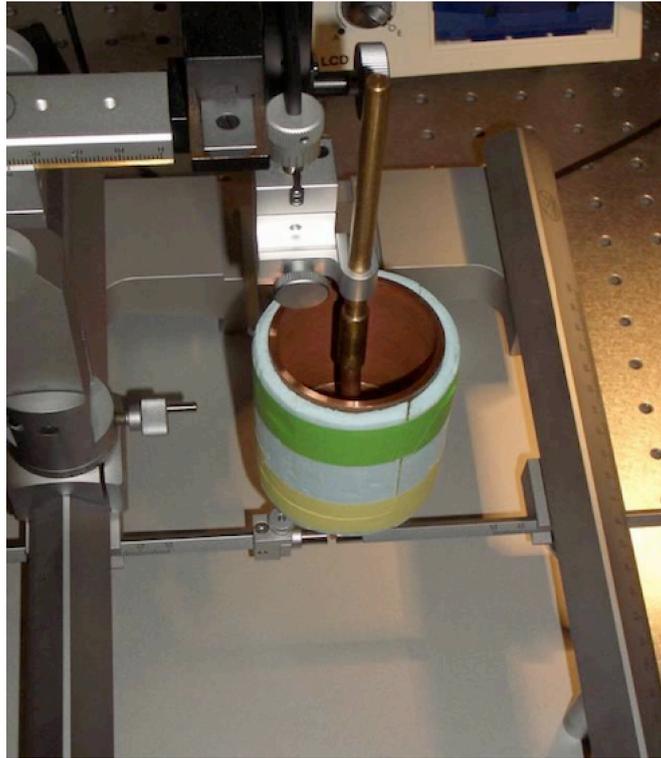


Abb. 4: Stereotaxie-Gerät zur Drei-Punkt-Fixierung des Kopfes mit Kupferhohlzylinder zur Applikation kortikaler Kälteläsion (aus Raslan et al., 2012. Eine Druckerlaubnis liegt nach Lizenzbestimmungen von *Creative Commons Attribution CC-BY 2.0*, (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0>) vor).

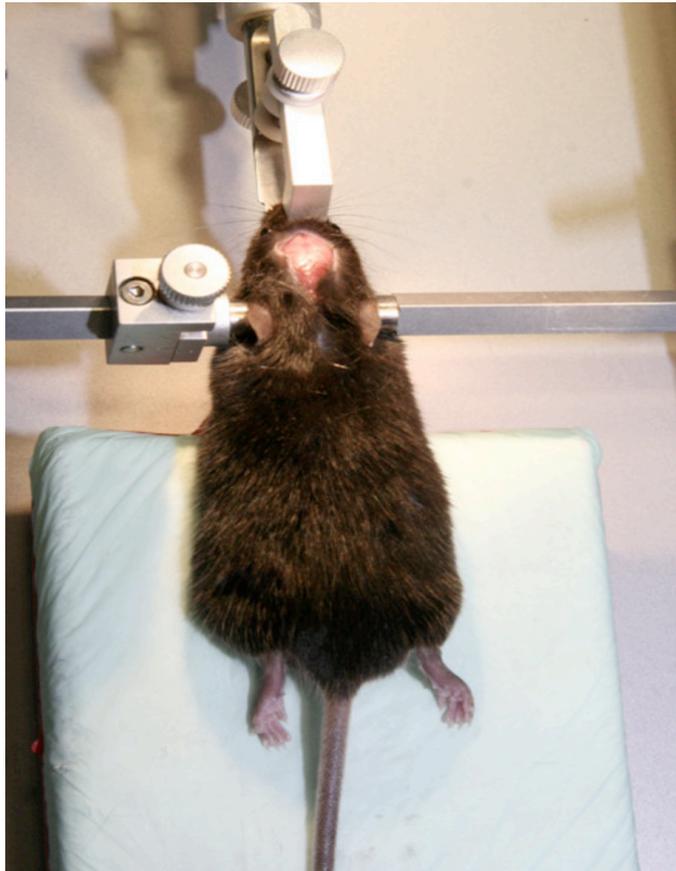


Abb. 5: Drei-Punkt-Fixierung des Kopfes in der stereotaktischen Halterung sowie Präparation der Kopfhaut nach Inzision von der Mittellinie nach lateral (aus Raslan et al., 2012. Eine Druck-erlaubnis liegt nach Lizenzbestimmungen von *Creative Commons Attribution CC-BY 2.0*, (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0>) vor).

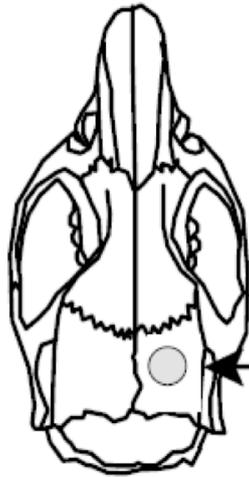


Abb. 6: Mausschädel mit Läsionsstelle (Pfeil) 1,5 mm lateral und 1,5 mm kaudal des *Bregmas* am rechten *Os parietale* (aus Raslan et al., 2012. Eine Druck-erlaubnis liegt nach Lizenzbestimmungen von *Creative Commons Attribution CC-BY 2.0*, (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0>) vor).

Die Koordinaten des Zielpunkts werden mit Hilfe des Stereotaxie-Geräts gemessen und lokalisiert. Die Kältesonde wird zunächst ungekühlt aufgesetzt und die Position der Sonde somit zur Läsionsinduktion in ihren Koordinaten festgelegt. Nach Entfernung der Sonde von der Zielstelle wird der Hohlzylinder (s. Abb. 7) mit flüssigem Stickstoff mit einer Temperatur von -196°C befüllt und für 90 Sekunden auf die Läsionsstelle aufgesetzt. Nach der Kälteapplikation wird die Sonde sofort wieder entfernt und die Haut mit einer Einzelknopfnahnt versorgt (Raslan et al., 2012).

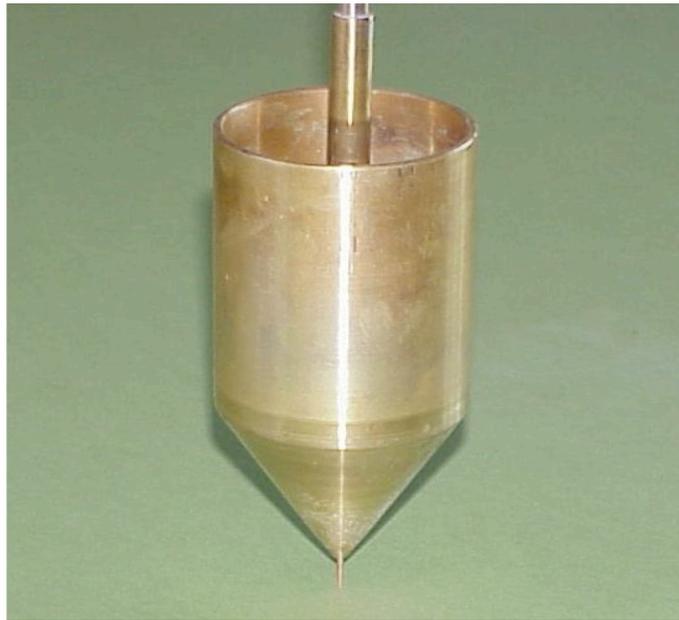


Abb. 7: Kältesonde zur Applikation der Kälteläsion, bestehend aus einem Kupferhohlzylinder und einem Kontaktstempel mit einem Durchmesser von 2,5 mm, der nach Befüllen des Zylinders mit flüssigem Stickstoff (-196°C) auf die Schädelkalotte aufgesetzt wird (aus Raslan et al., 2012. Eine Druckerlaubnis liegt nach Lizenzbestimmungen von *Creative Commons Attribution CC-BY 2.0*, (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0>) vor).

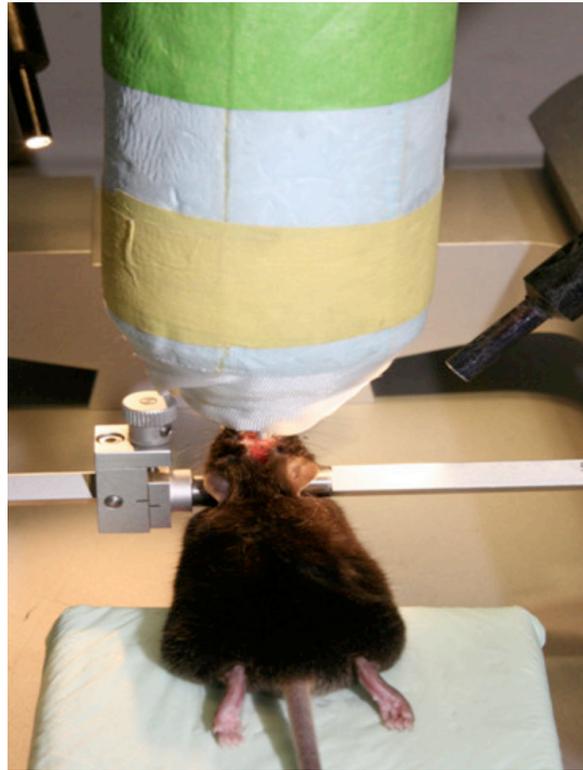


Abb. 8: Applikation der Kälteläsion nach Aufsetzen des Hohlzylinders mit flüssigem Stickstoff (-196°C) wie bereits beschrieben (aus Raslan et al., 2012. Eine Druck-erlaubnis liegt nach Lizenzbestimmungen von *Creative Commons Attribution CC-BY 2.0*, (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0>) vor).

2.2.1.4 Posttraumatische Phase

Nach der Läsionsinduktion wurden die Mäuse zunächst in ihre vorgewärmten Käfige gebracht, wo sie erwachen. Die Einstreu wurde mit Zellstoff abgedeckt, damit Einstreupartikel die Atemwege nicht verlegen können. Die Lagerung bis zum Aufwachen erfolgte in Seitenlage. Nach vollständigem Erwachen wurden sie in ihren Heimatkäfig zurückgesetzt.

2.2.1.5 Hirnentnahme

Die Entnahme der Gehirne erfolgte am ersten posttraumatischen Tag. Die Tötung der Tiere erfolgte durch eine tiefe und schließlich letale CO₂-Narkose. Anschließend wurden die Hirne nach der Schädelöffnung zur weiteren Bearbeitung entnommen.

2.2.2 Bestimmung des Läsionsvolumens

Die Darstellung und Quantifizierung des Läsionsvolumens erfolgte mittels einer Färbung mit 2 % 2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC) in phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) 24 Stunden nach der Kälteläsion. Hierzu wurden die Hirne direkt nach der Entnahme in 6 coronare Scheiben mit einer Schichtdicke von 1 mm geschnitten und für ca. 15 Min. bei Raumtemperatur in der TTC-Lösung inkubiert. Damit konnten Läsionsareale vom vitalen Hirngewebe differenziert werden. Anschließend wurden die Gehirnscheiben in 4 %iger Paraformaldehyd-lösung (PFA) fixiert. Die planimetrische Berechnung des Läsionsvolumens erfolgte nach Einscannen der Scheiben unter Berücksichtigung der Schichtdicke von 1 mm mittels Open Source Software „ImageJ“ (National Institutes of Health, USA) nach der folgenden Formel:

$V \text{ lesion (mm}^3) = (\text{area TTC section 1 [mm}^2] \times 1.0\text{mm}) + (\text{area TTC section 2 [mm}^2] \times 1.0\text{mm}) + (\text{area TTC section 3 [mm}^2] \times 1.0\text{mm}) + (\text{area TTC section 4 [mm}^2] \times 1.0\text{mm}) + (\text{area TTC section 5 [mm}^2] \times 1.0\text{mm}) + (\text{area TTC section 6 [mm}^2] \times 1.0\text{mm}).$

TTC ist ein farbloser und hydrophiler Redox-Indikator, der sich als unspezifischer Protonenakzeptor mitochondrieller Enzymsysteme, durch enzymatische Reduktion zum roten, lipophilen und lichtempfindlichen Formazan umwandeln lässt. In avitalem Gewebe bleibt die Rotfärbung aus, so dass man mittels der TTC-Färbung avitales, stoffwechsellinaktives Gewebe (weiße Areale) vom gesunden Gewebe (rote Areale) unterscheiden kann (Bederson et al., 1986; Raslan et al., 2010).

2.2.3 Ermittlung des Hirnödems

Die Evans-Blau Färbung dient der Darstellung von Zellmembranläsionen und damit zur Evaluation der Barriestörung/Permeabilität der BHS. Hierfür wurde den Mäusen am ersten posttraumatischen Tag 2 % Evans Blau intravenös injiziert. Evans-Blau ist ein blauer und wasserlöslicher Farbstoff, der sich mit hoher Affinität an Serumalbumin bindet und damit als Marker für die Permeabilität der BHS gilt. Durch Bindung an Albumin entsteht ein Farbstoff-Protein-Komplex, welcher bei intakter BHS nicht von intravasal in das Hirngewebe austreten kann. Kommt es aber zu einer Störung z.B. nach einem Trauma, kann dieser Farbstoff-Protein-Komplex die BHS passieren und in das Hirngewebe austreten. Es findet eine Blaufärbung des lädierten Gewebes statt. Die Stärke der Evans Blau-Extravasation korreliert mit dem Ausmaß des Hirnödems, welches wiederum dem Ausmaß der Störung der BHS entspricht (Wolman et al., 1981).

23 Stunden nach der Läsion erfolgte die i.v.-Injektion von 200 µl Evans Blau-Lösung. Nach einer Inkubationszeit von einer Stunde wurden die Tiere durch CO₂-Inhalation narkotisiert, wie bereits beschrieben getötet und die Hirne anschließend entnommen. Im Anschluss wurden das Kleinhirn und der *Bulbus olfactorius* vom Großhirn abgetrennt und die Hirne für eine Stunde in 4 % PFA fixiert. Dabei ist zu beachten, dass die Proben jederzeit vor Licht geschützt bearbeitet werden, da Evans Blau sonst ausbleicht und somit die Ergebnisse verfälscht werden könnten. Um das zu verhindern, wurden die Proben mit Aluminiumfolie abgedeckt. Das fixierte Gewebe wurde zunächst in ipsi- und kontralaterale Probe geteilt und dann in 6 mm dicke coronare Scheiben geschnitten. Den Proben wurde dann jeweils 500 µl Formamid hinzugegeben und für ca. 24 Stunden bei 50°C im Heizblock inkubiert. Nach Zentrifugation wurde 50 µl des Überstands in eine 96-Well-Spitzbodenplatte überführt. Als Negativkontrolle wurde 2-mal 50 µl Formamid aufgetragen. Anschließend wurde eine Fluoreszenzmessung bei einer Anregungswelle von 620 nm und einer Emissionswelle von 680 nm durchgeführt. Die Quantifizierung der ins Gewebe ausgetretenen Menge an Evans Blue erfolgte mittels einer Eichreihe (Austin et al., 2009; Langhauser et al., 2012).

Die Ermittlung des Nass-/Trockengewichts erfolgte nach Überführung der Hirnscheiben mit Läsionsareal in Reaktionsgefäße. Zunächst wurde das Nassgewicht der Hirne bestimmt und anschließend über Nacht in einem Brutschrank/Inkubator bei 50°C trocknen gelassen, um das Trockengewicht zu ermitteln. Die Differenz zwischen Nass- und Trockengewicht wurde zur Berechnung des prozentualen Wasseranteils der Probe (s. Formel unten) und somit zur Ermittlung des Hirnödems herangezogen.

$$((\text{Nassgewicht} - \text{Trockengewicht}) / \text{Nassgewicht}) \times 100$$

2.2.4 Western Blotting zum Nachweis der Thrombusbildung und Bestimmung der BHS-Störung

Zur Untersuchung der Thrombusbildung und der BHS-Störung wurden Western Blots durchgeführt. Beim Western Blot handelt es sich um ein Verfahren zum immunchemischen Nachweis von Proteinen nach Auftrennung von Proteingemischen nach Molekülgröße mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).

2.2.4.1 Probenaufbereitung

Zunächst erfolgte die Aufbereitung von Proteinproben. Den Proben wurde jeweils 1 ml Lysepuffer zugegeben und mit einem Stempel zerkleinert. Nach Zugabe von je 500 µl Proteaseinhibitormix wurden die Proben durch wiederholtes Aufnehmen mit einer Insulinspritze homogenisiert und anschließend bei 4°C und 14000 U/Min für 20 Min. zentrifugiert. Der abzentrifugierte Überstand wurde dann 1:10 mit PBS verdünnt und die Pellets verworfen.

2.2.4.2 Proteinquantifizierung

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte anhand einer Eichreihe, die wie folgt hergestellt wurde:

Standard	BSA Lösung	ddH ₂ O [µl]	Standard [µg/ml]
A	300 µl 2 mg/ml BSA Stock	0	2000
B	375 µl 2 mg/ml BSA Stock	125	1500
C	325 µl 2 mg/ml BSA Stock	325	1000
D	175 µl Standard B	175	750
E	325 µl Standard C	325	500

F	325 µl Standard E	325	250
G	325 µl Standard F	325	125
H	300 µl Standard G	450	50
I	400 µl Standard H	400	25

Anschließend wurde die BCA-Reaktionslösung aus BCA-Kits A und B im Verhältnis 50:1 angesetzt. Die Standardreihe und Proben wurden mit 10 µl in Duplikaten auf eine 96-Well-Spitzbodenplatte aufgetragen, 200 µl BCA-Reaktionslösung hinzugefügt und dann 30 Min. bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Nach 30 Min. wurde die Absorption im Spektrophotometer bei 570 nm gemessen. Zur Berechnung der Proteinkonzentration in den Proben wurden die gemessenen Werte in Excel-Tabelle eingegeben. Dann erfolgte die Verdünnung der Proben auf eine einheitliche Proteinkonzentration vor der SDS-PAGE.

2.2.4.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Bei der SDS-PAGE wird als Trennmedium ein diskontinuierliches Polyacrylamid-Gel verwendet. Zusätzlich kommt das anionische Detergenz SDS (Natriumdodecylsulfat) zum Einsatz. Durch die negative Ladung des SDS werden die Eigenladungen der Proteine überdeckt und es entstehen Komplexe mit konstanter, negativer Ladungsverteilung, die sich gegenseitig abstoßen. Vor der SDS-PAGE findet zunächst die Denaturierung der Proteine durch Erhitzen auf 95°C statt. Auf diese Weise werden Sekundär- und Tertiärstrukturen der Proteine aufgebrochen und alle Proteinmoleküle gleichförmig gestreckt. Die Proteine wandern durch Anlegen einer elektrischen Spannung abhängig von ihrer Molekülgröße durch ein Polyacrylamid-Gel definierter Porengröße zur Anode. Ihre Laufgeschwindigkeit ist dabei umgekehrt proportional zur Proteingröße (Smith, B. J., 1994).

Für die Gelelektrophorese wurden Vertikal-Gelelektrophorese-Systeme (Mini-PROTEAN® Tetra System) verwendet. Zunächst wurden Acrylamid-Trenngele (10 % oder 15 %) gegossen (s. Puffer und Lösungen) und mit Isopropanol überschichtet. Nach der Polymerisation wurde das Isopropanol entfernt, dann sofort das Sammelgel (5 %, s. Puffer und Lösungen) darüber gegossen und mit einem Kamm versehen. Nach der Polymerisation des Sammelgels wurden jeweils zwei Gele in eine Apparatur eingespannt und in die Elektrophoresekammer überführt, die mit Laufpuffer (s. Puffer und Lösungen) gefüllt wurde. Die Proteinlösung wurde auf die gewünschte Proteinkonzentration gebracht und mit Probenpuffer (Laemmli-Puffer) versetzt. Dann wurde die Lösung für 5 Min. bei 95°C aufgeköcht und anschließend kurz abzentrifugiert. Nach Entfernen des Kamms konnten die Taschen je mit 20 µg Probe beladen werden. Nach Auftragen der Proben und des Größenmarkers erfolgte die Gelelektrophorese bei 20 mA/Gel. Dabei bildete das im SDS-Probenpuffer enthaltene Bromphenolblau eine Lauffront. Sobald diese am Gel-Ende ankam, wurde die Elektrophorese beendet und das Gel für das Blotting aus der Apparatur entfernt.

2.2.4.4 Semi-Dry-Blotting

Nach Auftrennung der Proteine nach Molekülgröße durch SDS-PAGE erfolgte der elektrophoretische Transfer der Proteine auf eine Polyvinylidenfluorid-(PVDF)-Membran durch Western Blotting, was dann durch Bindung spezifischer Antikörper detektiert werden kann.

Nach Äquilibration der PVDF-Membran in Methanol wurden Membran und Filterpapiere mit Blottingpuffer angefeuchtet. Anschließend wurde der Blot (Sandwich) auf der Bodenplatte des Blotters *Mini Trans Blot Cell* wie folgt aufgebaut:

3x Filterpapier
PVDF-Membran
Polyacrylamid-Gel
3x Filterpapier

Um das Auftreten von Luftblasen innerhalb des Sandwichs zu vermeiden, wurde ein Glasstab darüber gerollt und dann das Blotten bei 100 mA/Gel gestartet. Dabei wurde die Spannung auf 25 V beschränkt. Nach erfolgreichem Transfer wurde die Membran entnommen, kurz in Waschpuffer gewaschen und anschließend 30 Min. in Blockpuffer bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubiert, um die unspezifischen Bindungsstellen zu blockieren. Danach erfolgte die Inkubation mit einem spezifischen Primärantikörper (Anti-Fibrin(ogen)), 1:500000, Anti-Claudin-5 1:2000, verdünnt in Blockpuffer, s. Reagenzien und Antikörper) bei 4°C über Nacht auf dem Schüttler. Die Membran wurde dann 3-mal 10 Min. in Waschpuffer gewaschen, um den ungebundenen Primärantikörper zu entfernen. Anschließend wurde die PVDF-Membran mit dem Sekundärantikörper aus Maus oder Kaninchen (Verdünnung 1:5000) 1 Stunde bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubiert. Durch die Konjugation des Sekundärantikörpers mit HRP (Meerrettichperoxidase) erfolgte dann die

Detektion mit dem *Western Lightning Plus-ECL* System. Hierfür wurden Reagenz A und B des ECL Systems im Verhältnis 1:1 gemischt, die Membran mit dieser Mischung 5 Min. lang inkubiert und anschließend in einer Röntgenkassette entwickelt.

2.2.5 Histologie und Immunhistochemie

Die immunohistochemischen Untersuchungen dienten dem Nachweis von eingewanderten Entzündungszellen im Läsionsareal.

Die zuvor mit einem Kryostat angefertigten 10 µm dicken coronaren Kryoschnitte wurden für die Mikroglia/Makrophagen-Färbung in 4 % PFA in PBS fixiert. Die Blockierung der Epitope erfolgte mit 10 % Pferdeserum in PBS mit 0,2 % Triton X für 1 Stunde bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer. Anschließend wurde die Lösung von den Schnitten abgekippt, dann der Primärantikörper mit PBS und 0,2 % Triton X sowie 1 % Pferdeserum verdünnt aufgetragen und über Nacht bei 4°C inkubiert. Am zweiten Tag wurden die Schnitte in PBS für 3-mal 10 Min. gewaschen. Zur Detektion der Antigen-Antikörper-Komplexe werden die Schnitte mit biotinyliertem Sekundärantikörper, der sich gegen den Primärantikörper richtet, für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erneutes Waschen der Schnitte in PBS 3-mal für 10 Min. Nach der Inkubation mit Avidin-Biotin-Komplex für 1 Stunde bei Raumtemperatur erfolgte erneutes Waschen in PBS. Während dessen wurde die DAB (Diaminobenzidin)-Lösung angesetzt, anschließend aufgetragen und für 10 Min. inkubiert und die Reaktion mit Aqua dest. gestoppt. Als letzten Schritt wurde Mayers Hämalaun-Lösung aufgetragen und anschließend in fließendem Wasser gewaschen, in aufsteigender Ethanolreihe entwässert und die Schnitte mit *Vitro Clud*® eingedeckt.

Des Weiteren wurde die Neutrophilen-Färbung durchgeführt. Hierfür wurden die Kryoschnitte in kaltem Aceton bei -20 ° für 15 Min. fixiert. Nach dem Trocknen wurden sie in 1x PBS 3-mal für 5 Min. gewaschen und für 1 Stunde bei Raumtemperatur in 5 % BSA in 1x PBS geblockt. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper (Ratte Anti-Maus Neutrophil, 1:1000 verdünnt) in 1 % BSA in 1x PBS bei 4°C über Nacht. Nach 3-mal 5-minütigem Waschen in 1x PBS erfolgte der POD-Block für 15 Min. bei Raumtemperatur. Nach erneutem Waschen wurden die Schnitte zur Detektion der Sekundärantikörper (Anti-Ratte biotinyliert, 1:100 verdünnt) in 1x BSA in 1x PBS für 45 Min. bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erneutes Waschen 3-mal für 5 Min. in 1 PBS und Inkubation mit dem Avidin-Biotin-Komplex für 35 Min. Nach erneutem Waschvorgang erfolgt das Auftragen der DAB-Lösung und Stoppen der Reaktion nach 10 Min. mit Aqua dest. und Dehydrierung in aufsteigender Alkoholreihe sowie Eindecken in *Vitro Clud*®.

Zur Beurteilung der Thrombusbildung in Gefäßen wurde u.a. die Hämatoxylin-Eosin-Färbung herangezogen. Die Kryoschnitte wurden nach Standardprotokoll für 5 Min. in Hämatoxylin-Lösung belassen und anschließend für 10 Min. in fließendem Wasser abgewaschen. Im Anschluss erfolgte die Färbung in 1 % Eosin-Lösung für 30 Sekunden mit Entwässerung durch aufsteigende Alkoholreihe mit Ethanol und zuletzt mit Xylol sowie Eindecken mit *Vitro Clud*®. Die Anzahl der okkludierten und freien Blutgefäße im Bereich der lädierten Areale wurden in jedem zehnten Kryoschnitt der Kontroll- und mit 15 IU C1-Inhibitor vorbehandelten Gruppe unter dem Mikroskop (Nikon Eclipse 50i) gezählt und der prozentuale Anteil berechnet.

3 Statistische Auswertung

Für die statistische Auswertung wurde GraphPad Prism 5.0 software package (GraphPad Software) verwendet. Die Berechnung der Normalverteilung erfolgte nach D'Agostino und Pearson *omnibus normality test*. Für die statistische Analyse von zwei normalverteilten unabhängigen Gruppen wurde der Student's t-Test, von mehr als zwei unabhängigen Stichproben die einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) mit *post hoc* Bonferroni zur Bestimmung von signifikanten Unterschieden verwendet. Ergebnisse mit $p < 0,05$ wurden als statistisch signifikant betrachtet. Soweit nicht anders angegeben, zeigen die Ergebnisse und Abbildungen den Mittelwert +/- Standardabweichung.

4 Ergebnisse

4.1 Läsionsvolumen nach Behandlung mit C1-Inhibitor

Zur Untersuchung der neuroprotektiven Wirkung des C1-Inhibitors bei SHT wie bereits beschrieben, wurde das Kälteläsionsmodell herangezogen, das eine Störung der BHS verursacht, welche mit Bildung eines vasogenen Ödems und Neuroinflammation einhergeht (Albert-Weissenberger und Sirén, 2010; Raslan et al., 2012). Hierfür wurden 6 Wochen alte männliche C57BL/6 Mäuse einer Kälteläsion unterzogen und 1 Stunde nach Trauma mit 7,5 IU und 15 IU C1-Inhibitor behandelt. Eine Kontrollgruppe erhielt entsprechend eine 0,9 % NaCl-Injektion. Zur Evaluation des Läsionsvolumens wurde die TTC-Färbung durchgeführt. Das lädierte Gewebe blieb farblos, wobei sich das vitale Gewebe rot anfärben ließ. Die Behandlung mit 15 IU und nicht mit 7,5 IU C1-Inhibitor zeigte im Vergleich zur Kontrollgruppe ein deutlich reduziertes Läsionsvolumen von > 75 % am Tag 1 nach dem Trauma (Läsionsvolumen: $5,5 \pm 1,4 \text{ mm}^3$ (Kontrollgruppe) vs. $1,7 \pm 0,4 \text{ mm}^3$ (15 IU C1-Inh.); (n=10/Gruppe); $**p < 0,01$; (s. Abb. 9 und 10).

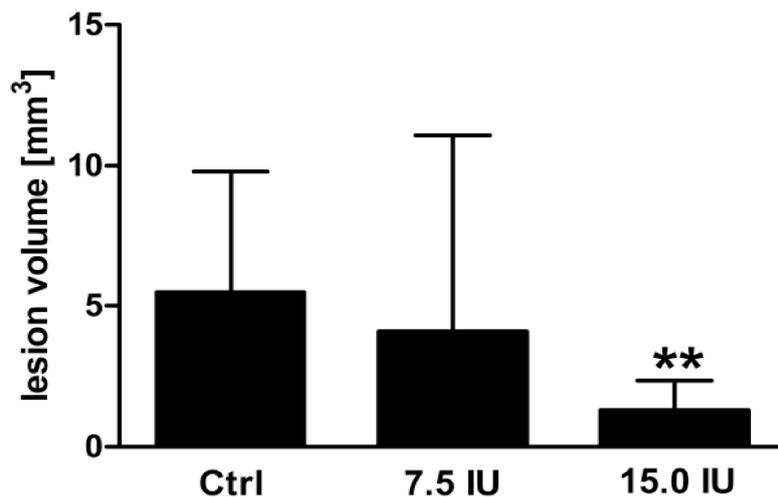
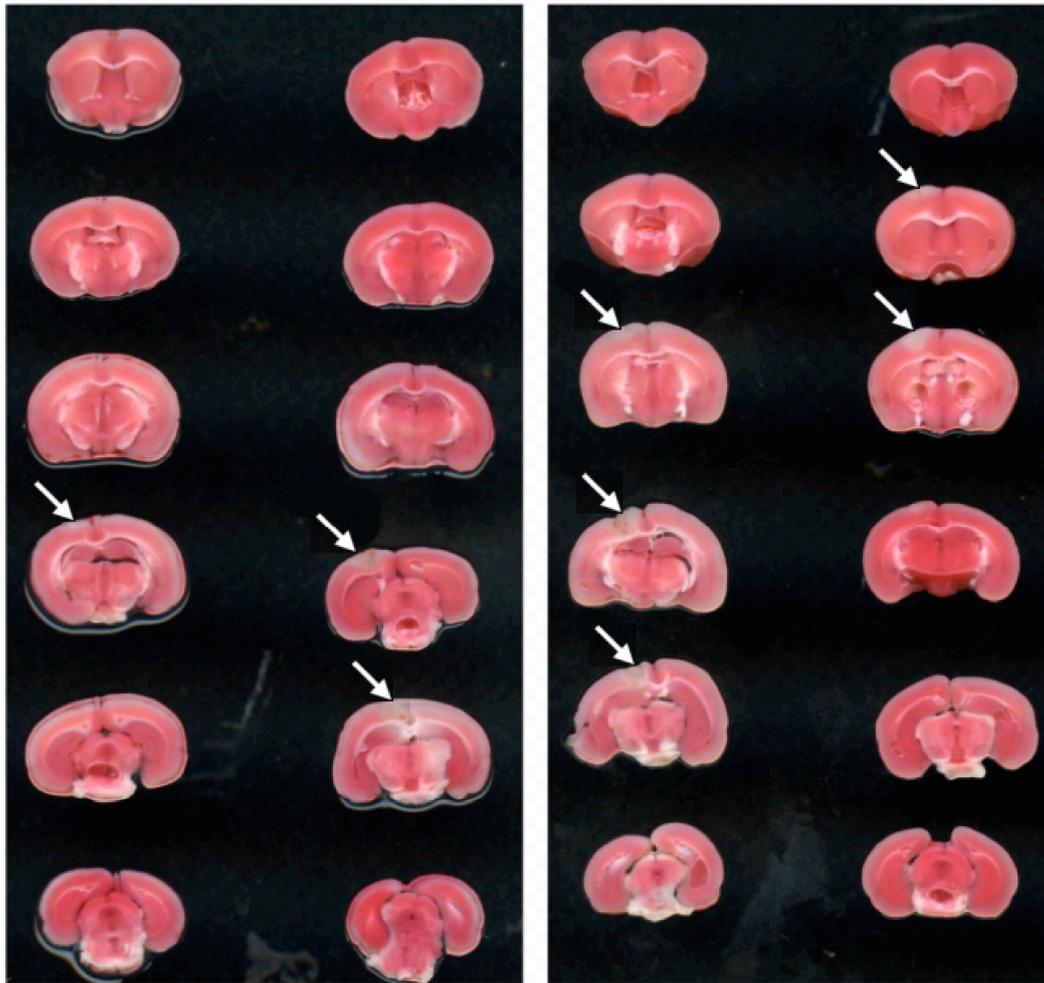


Abb. 9: Nach Behandlung mit 15 IU C1-Inhibitor zeigte sich ein deutlich reduziertes Läsionsvolumen im Vergleich zur Kontrollgruppe (Ctrl); (n=10/Gruppe); $**p < 0,01$.



15 IU Berinert

Ctrl

Ctrl

15 IU Berinert

Abb. 10: Repräsentative TTC (2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid)-Färbungen der coronaren Maushirnschnitte nach Behandlung mit 15 IU C1-Inh. 1 Stunde nach kortikaler Kälteläsion. Im Vergleich zur Kontrollgruppe erkennt man ein kleineres Läsionsvolumen, was sich auch in der Abbildung 9 durch planimetrische Volumenmessung bestätigt (Der Pfeil markiert jeweils die Läsionsstelle).

4.2 C1-Inhibitor reduziert das vasogene Hirnödeme nach Trauma

In weiteren Versuchen wurden die Wirkmechanismen des C1-Inhibitors auf die Entstehung des vasogenen Ödems nach Trauma untersucht. Das vasogene Hirnödeme ist auf eine Störung der BHS zurückzuführen (Mendelow et al., 1983). Der endogene Serinprotease-Inhibitor C1-Inhibitor wirkt der Aktivierung des Plasmakallikreins und FXIIa (Davis et al., 2010) und somit der Aktivierung des Kontakt-Kinin-Systems entgegen, welches bei der Regulation der Vasopermeabilität eine zentrale Rolle spielt.

Zur Untersuchung des Ausmaßes der BHS-Störung wurde den Versuchstieren, die eine Stunde nach Läsionsinduktion 15 IU C1-Inhibitor bzw. Vehikel erhielten, 0,1 ml 2 % Evans Blau (wasserlöslicher, mit hoher Affinität an Albumin bindender Farbstoff, als Marker für die Gefäßpermeabilität) intravenös verabreicht. Am Tag 1 nach Kälteläsion erfolgte die Auswertung der Evans-Blau-Extravasation. Hiermit konnte gezeigt werden, dass eine Behandlung mit 15 IU C1-Inhibitor eine Stunde nach Kälteläsion eine signifikant geringere Evans Blau-Extravasation im Vergleich zur Kontrollgruppe zur Folge und somit einen stabilisierenden Effekt auf die BHS hat (s. Abb. 11B).

Die Bestimmung des Hirnödems in Mäusen, die 1 Stunde nach Trauma mit 15 IU C1-Inhibitor behandelt wurden, erfolgte mittels Nassgewicht/Trockengewicht-Methode mit Berechnung des prozentualen Wasseranteils wie bereits beschrieben.

Hierbei zeigte sich eine signifikant geringere Hirnödembildung nach Gabe von 15 IU C1-Inhibitor, was für eine posttraumatische Stabilisierung der BHS spricht ($80,05 \pm 1,50$ % (Kontrollgruppe) vs. $78,50 \pm 0,45$ % (15 IU C1-Inh.); (n=6/Gruppe); *p < 0,05; (s. Abb. 11A).

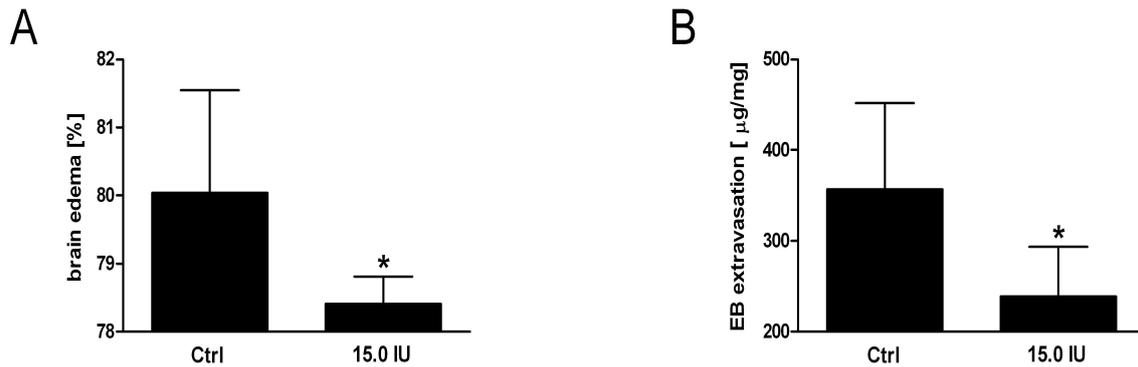


Abb. 11: Behandlung mit 15 IU C1-Inhibitor stabilisiert die BHS und reduziert die Hirnödembildung nach kortikaler Kälteläsion. **A:** Signifikant geringere Hirnödembildung nach Gabe von 15 IU C1-Inhibitor durch Stabilisierung der BHS im Vergleich zur Kontrollgruppe (n=6/Gruppe); (*p < 0,05). **B:** Evans Blau (EB)-Extravasation nach Applikation von 15 IU C1-Inhibitor signifikant geringer, was auf eine geringere Gefäßpermeabilität hindeutet (n=6/Gruppe); (*p < 0,05).

Des Weiteren wurde die relative Proteinexpression des *tight junction*-Proteins Claudin-5 durch Western Blotting untersucht. Wie bereits beschrieben, tragen die *tight junction*-Proteine wesentlich zur BHS-Funktion bei. Bei deren reduzierten Expression wird auch die Gefäßpermeabilität gesteigert. Die im Vergleich zur Kontrollgruppe erhöhte relative Proteinexpression nach Behandlung mit 15 IU C1-Inhibitor zeigt den stabilisierenden Effekt des C1-Inhibitors auf die Funktion der BHS (Optische Densität in der ipsilateralen Hirnhälfte: $0,2 \pm 0,1$ (Kontrollgruppe) vs. $0,5 \pm 0,2$ (15 IU C1-Inh.); (n=5-6/Gruppe); $p < 0,05$. Optische Densität in der kontralateralen Hirnhälfte: $0,7 \pm 0,2$ (Kontrollgruppe) vs. $0,7 \pm 0,4$ (15 IU C1-Inh.); (n=5-6/Gruppe); nicht signifikant, (s. Abb. 12).

Claudin-5

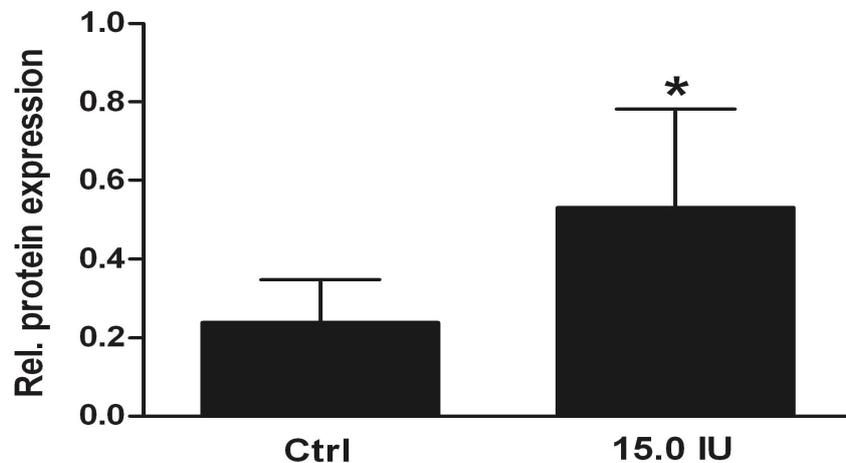


Abb. 12: Relative Proteinexpression von Claudin-5 im ipsilateralen Kortex von mit 15 IU C1-Inhibitor-behandelten Mäusen im Vergleich zur Kontrollgruppe am Tag 1 nach kortikaler Kälteläsion, bestimmt durch densitometrische Quantifizierung nach Western Blotting. Es zeigt sich eine signifikant höhere relative Proteinexpression, welche zur Stabilisierung der BHS-Funktion beiträgt (n=5-6/Gruppe); (*p < 0,05).

4.3 Antiinflammatorischer Effekt des C1-Inhibitors

Die Immunhistochemie ist eine häufig verwendete Methode, die zur Identifizierung von bestimmten Strukturen, Zelltypen oder Gewebeeigenschaften mit Hilfe von markierten Antikörpern dient. Sie beruht auf dem Prinzip der Antikörper-Antigen-Reaktion, wobei es aufgrund der hohen Affinität eines Antikörpers zu einem spezifischen Antigen bzw. Epitop zu einer starken Bindung zwischen den beiden kommt und durch bestimmte an Antikörper gekoppelte Detektionssysteme deren Epitope sichtbar werden.

In unseren Versuchen wurde die Immunhistochemie zum Nachweis der lokalen Entzündungsreaktion in lädierten Hirnanteilen verwendet. Die Störung der BHS begünstigt die Migration von Immunzellen ins Gewebe. Hierfür wurden immu-

histochemische Färbungen Identifizierung der Neutrophilen und Makrophagen/ Mikroglia (CD11b-Antikörper) 24 Stunden nach Läsionsinduktion durchgeführt. Es ist bereits bekannt, dass der C1-Inhibitor die Endothel-Leukozyten-Adhäsion verhindert, welche eine wichtige Komponente der Entzündungsreaktion darstellt (Cai und Davis, 2003). Die immunhistochemischen Färbungen haben gezeigt, dass in den Läsionsarealen der Mäuse, denen 1 Stunde nach Trauma 15 IU C1-Inhibitor injiziert wurde, signifikant weniger inflammatorische Zellen nachgewiesen wurden als in der Kontrollgruppe (s. Abb. 13 und 14). Die von Kollegen durchgeführte Quantifizierung ergab folgende Ergebnisse: CD11b-positive Zellen/mm² in der ipsilateralen Hirnhälfte: 294,6 ± 200,7 (Kontrollgruppe) vs. 49,4 ± 52,9 (15.0 IU C1-Inh.); (n=5/Gruppe); p < 0,05; CD11b-positive Zellen/mm² in der kontralateralen Hirnhälfte: 13,1 ± 8,8 (Kontrollgruppe) vs. 9,6 ± 6,6 (15.0 IU C1-Inh.); (n=5/Gruppe); nicht signifikant (s. Abb. 14).

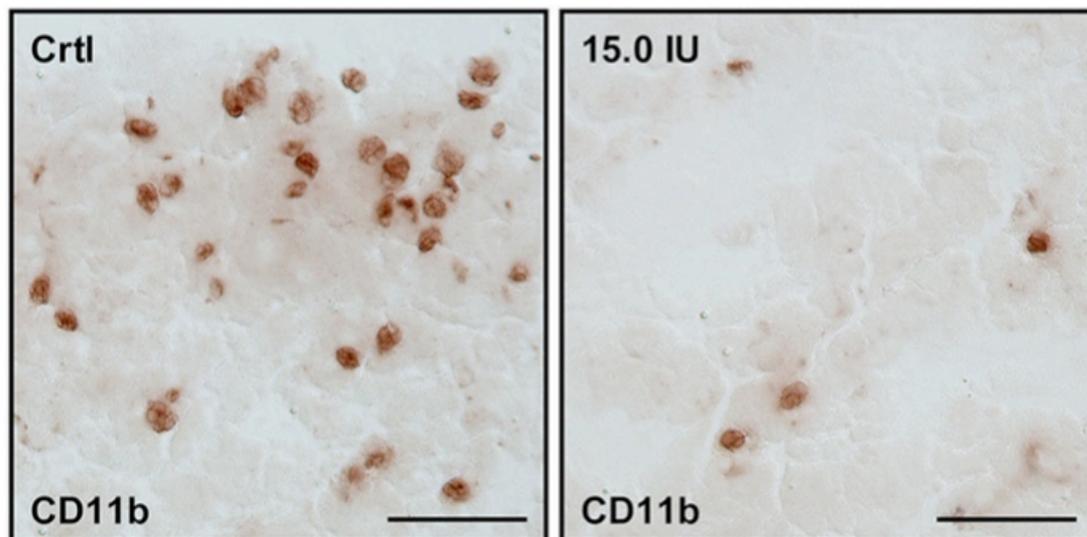


Abb. 13: Repräsentative immunhistochemische Makrophagen-Färbungen in 15 IU C1-Inhibitor und Vehikel-behandelten Mäusen nach kortikaler Kälteläsion. Die Zahl von CD11b-positiven Zellen nach Behandlung mit 15 IU C1-Inhibitor deutlich reduziert; (n=5/Gruppe). Balken = 50 µm.

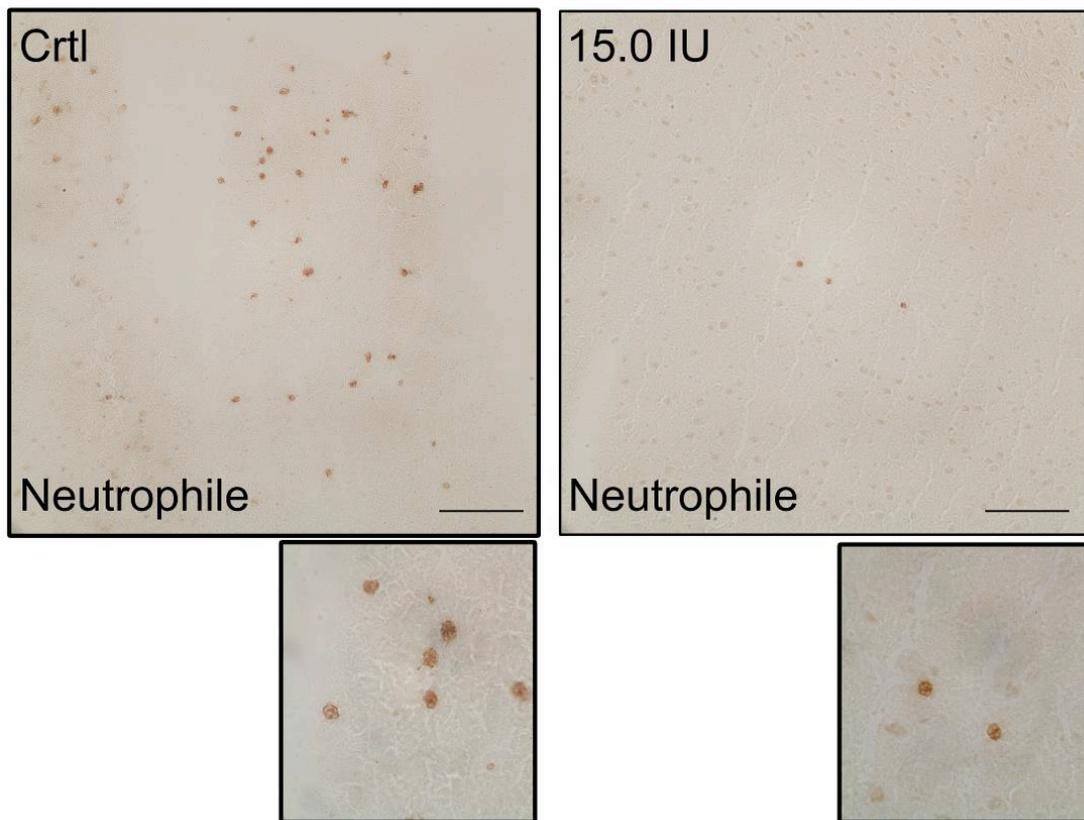


Abb. 14: Repräsentative immunohistochemische Färbungen von Neutrophilen in 15 IU C1-Inhibitor und Vehikel-behandelten (Ctrl) Mäusen nach kortikaler Kälteläsion. Infiltration von Neutrophilen ist nach Behandlung mit 15 IU C1-Inhibitor deutlich reduziert; (n=5/Gruppe). Balken = 100 μ m, Ausschnitte unten in 5facher Vergrößerung.

4.4 Antithrombotischer Effekt des C1-Inhibitors

Der intrinsische Weg der Blutgerinnungskaskade beginnt mit Aktivierung durch FXIIa, welcher somit letztendlich zur Fibrinbildung führt. FXIIa kann unter anderem auch durch C1-Inhibitor blockiert werden (Davis et al., 2008). Aus diesem Grunde wurde der Effekt des C1-Inhibitors auf die posttraumatische Thrombusbildung untersucht. Hierfür wurde die Menge an Fibrin(ogen) im Läsionsareal bei Mäusen nach C1-Inhibitor-Behandlung bzw. in der Kontrollgruppe durch Western Blot detektiert. Hierbei werden die Proteine in dem zu untersuchenden Gewebe per Gel-Elektrophorese entsprechend ihrer Größe, Ladung oder anderer Eigenschaften aufgetrennt und mithilfe spezifischer Antikörper identifiziert. Am Tag 1 nach Neurotrauma wurde im Läsionsareal bei Mäusen, die mit 15 IU C1-Inhibitor behandelt wurden, eine signifikant geringere Fibrin(ogen)menge als in der Kontrollgruppe durch densitometrische Auswertung nachgewiesen, was auf eine reduzierte Thrombusbildung hinweisen könnte (s. Abb. 15) (Optische Densität in der ipsilateralen Hirnhälfte: $3,7 \pm 1,7$ (Kontrollgruppe) vs. $1,9 \pm 0,8$ (15 IU C1-Inh.); $p < 0,05$; Optische Densität in der kontralateralen Hirnhälfte: $1,2 \pm 0,4$ (Kontrollgruppe) vs. $1,4 \pm 0,3$ (15 IU C1-Inh.); (n=5-6/Gruppe); nicht signifikant.

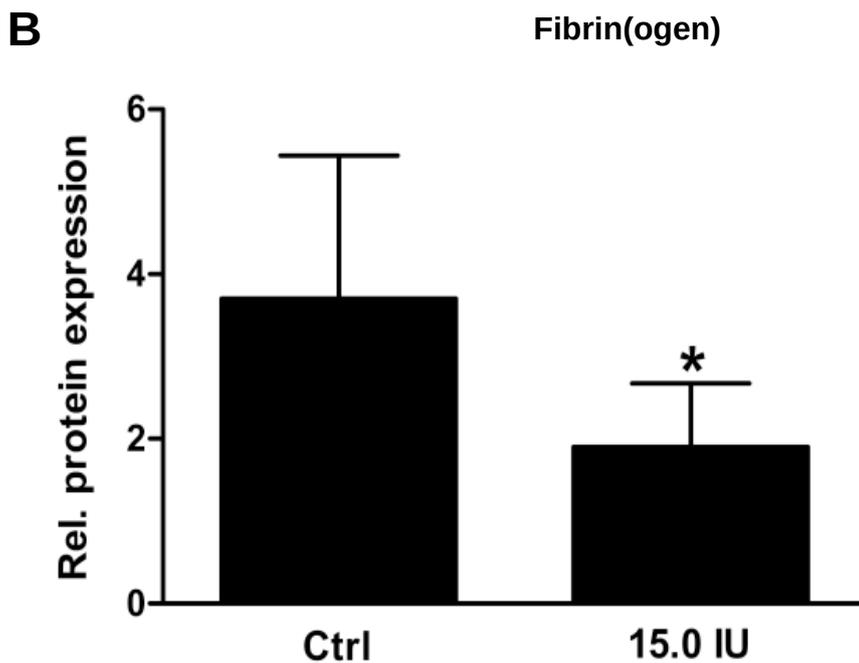
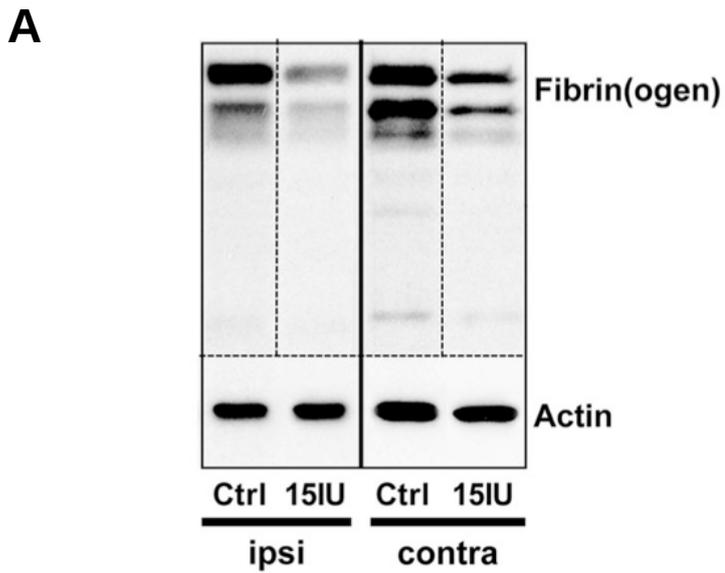


Abb. 15: Akkumulation von Fibrin(ogen) im ipsilateralen und kontralateralen Kortex in der Vehikel-behandelten und in 15 IU C1-Inhibitor-behandelten Mäusen nach kortikaler Kälteläsion wurde durch Western Blotting untersucht und mit Densitometrie der Proteinbanden quantifiziert. Das repräsentative Immunoblot (**A**) und die densitometrische Messung (**B**) zeigen eine signifikante Reduktion der relativen Proteinexpression von Fibrin(ogen); (n=5-6/Gruppe); (*p < 0,05).

Zusätzlich untersuchten meine Kollegen und ich anhand der Hämatoxylin-Eosin-Färbung die Häufigkeit von Gefäßokklusionen in den Hirngefäßen nach Kälteläsion in C1-Inhibitor-behandelten und Vehikel-behandelten Mäusen (s. Abb. 16). Die Behandlung mit C1-Inhibitor führte zur signifikant weniger Thrombusbildung in Gefäßen (s. Abb. 17).

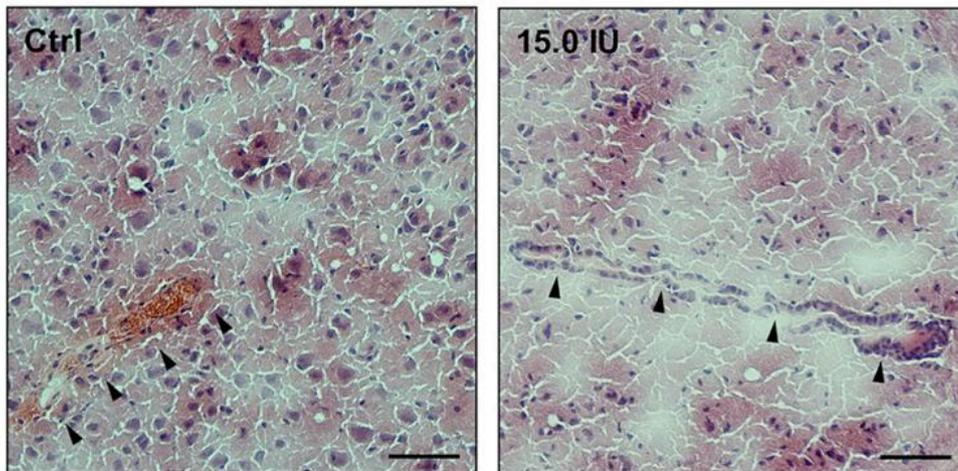


Abb. 16: Hämatoxylin-Eosin-Färbung: Nachweis von Gefäßokklusionen durch thrombotisches Material nach Kälteläsion im Hirnschnitt von einer unbehandelten Maus (links) und im Hirnschnitt nach Behandlung mit 15 IU C1-Inhibitor (rechts); (n=4/Gruppe). Balken = 50 μ m.

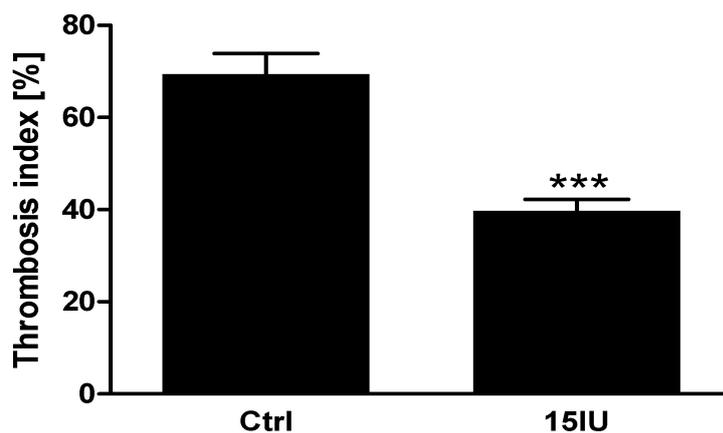


Abb. 17: Die Behandlung mit C1-Inhibitor nach kortikaler Kälteläsion führt zu signifikant weniger Thrombusbildung in Gefäßen; (n=4/Gruppe); (69,5 \pm 2.2 vs. 39.7 \pm 1.7.Mittelwert \pm Standardfehler); (***)p < 0.001).

5 Diskussion

5.1 Methodische Überlegungen

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass nach experimenteller traumatischer Hirnverletzung eine therapeutische Behandlung mit dem C1-Inhibitor zu einer Reduktion der Hirnläsion, des Hirnödems, der Inflammation und Thrombusbildung in den zerebralen Gefäßen führt. Bevor im folgenden Abschnitt diese Ergebnisse im Kontext der aktuellen Literatur diskutiert werden, wird zunächst kurz auf die Wahl der Methoden und deren Limitationen eingegangen.

Wahl des Tiermodells:

Menschen erleiden SHT durch äußere Gewalteinwirkung auf den Kopf, welche eine Schädigung des Hirngewebes verursacht. Die dabei entstehenden Verletzungsmuster sind sehr heterogen und können umschriebene (fokale) oder diffuse Veränderungen samt aller Übergänge und Kombinationen nach sich ziehen. Aufgrund dieser Problematik wurden zahlreiche Tiermodelle etabliert, um die Pathomechanismen, die nach SHT ablaufen zu erforschen und damit Informationen über potentiell therapeutisch nutzbare Zielstrukturen zu erhalten. Dennoch kann ein einzelnes Tiermodell keinesfalls alle pathologischen Prozesse des humanen SHT abbilden und so kann jedes Tiermodell für sich nur bedingt auf die klinische Situation übertragen werden (Marklund und Hillered, 2011; Albert-Weissenberger et al., 2010). In der vorliegenden Studie wurde das fokale Kälteläsionsmodell in der Maus verwendet. In diesem Modell wird mittels Kälte eine fokale Läsion induziert. Es handelt sich um ein gut standardisiertes und technisch einfaches Modell, in dem die ausgelösten Schädigungen ausgesprochen gut reproduzierbar sind. Im Gegensatz zu anderen gängigen SHT-Tiermodellen, beispielsweise dem „*Weight drop*“- oder „*Controlled cortical impact*“-Tiermodell fehlen Contrecoup- und diffuse Hirnverletzungen. Jedoch bildet sich beim Kälteläsionsmodell zuverlässig ein vasogenes Hirnödem und die damit einhergehende Inflammation ab. Bei Patienten mit SHT tragen diese

Pathomechanismen in der akuten Phase wesentlich zur Mortalität und auch der Morbidität bei. Die therapeutische Behandlung dieser Patienten ist limitiert. Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit einem Therapieansatz, der diese Pathomechanismen vermindern könnte.

Wahl des Wirkstoffes:

Studien belegen, dass nach Hirnverletzungen wie beispielsweise einem Schlaganfall oder SHT das Kontakt-Kinin-System vermutlich gemeinsam mit der intrinsischen Gerinnung zu einer Ausweitung des Hirnschadens beiträgt (Kunz et al., 2013; Hopp et al., 2016, 2017; Göb et al., 2015). Der wichtigste endogene Inhibitor des Kallikrein-Kinin-Systems und ebenfalls ein Inhibitor der intrinsischen Gerinnung ist der C1-Inhibitor. Im sogenannten „*Controlled cortical impact*“-Tiermodell in der Maus wurde bereits gezeigt, dass eine therapeutische Behandlung mit 15 IU C1-Inhibitor nach SHT die Schäden vermindert (Longhi et al., 2008, 2009). Daher stellt der C1-Inhibitor einen vielversprechenden Wirkstoff zur Behandlung des SHT dar. Aus translationaler Sicht ist der C1-Inhibitor sehr interessant, da er bereits für die Behandlung von Patienten mit hereditärem Angioödem zugelassen ist. Während der C1-Inhibitor in der Maus eine Halbwertszeit von 9-9,5 Stunden nach intravenöser Applikation (Caliezi et al., 2000; Dickneite, G., 1993) aufweist, ist die Halbwertszeit im Menschen sogar mit 62 Stunden nach i.v.- und 120 Stunden nach subkutaner Applikation deutlich höher (Martinez-Saguer et al., 2014).

5.2 Diskussion der Ergebnisse

Bisher wurden in verschiedenen experimentellen Arbeiten die Rolle des Kallikrein-Kinin-Systems untersucht und nachgewiesen, dass die Defizienz oder Hemmung einzelner Komponenten die sekundäre Hirnschädigung nach einem Neurotrauma dezimiert. Als vielversprechende therapeutische Zielstrukturen galten die Kinin-Rezeptoren, welche die Effekte der Kinine vermitteln (u.a. Ivashkova et al., 2006; Raslan et al., 2010; Zweckberger und Plesnila, 2009; Albert-Weissenberger et al., 2012). Eine Translation der experimentellen Ergebnisse in die Klinik war jedoch bisher nicht möglich (Ker und Blackhall, 2008; Wheaton et al., 2009). Es könnte sinnvoller sein, auf den Ebenen, die Kinin-Rezeptoren vorgelagert sind, zu inhibieren. Für einen solchen Ansatz sprechen zwei kürzlich veröffentlichte Studien, welche die Rolle des FXII nach experimentellem SHT untersuchten. Eine Defizienz des FXII bzw. eine therapeutische Inhibition des FXIIa führte im Kälteläsionsmodell zu kleineren Hirnläsionen, einem weniger ausgeprägten Hirnödem und weniger Inflammation (Hopp et al., 2017). Im „*Weight-drop*“-Modell, welches diffuse und fokale Schäden im Hirn induziert und sich für die Testung funktionaler Defizite nach Hirnverletzung eignet, erholten sich die FXII-defizienten Mäuse bzw. die Mäuse, in denen der FXIIa gehemmt wurde, deutlich schneller als die entsprechenden Kontrollmäuse (Hopp et al., 2016). In beiden Modellen bewirkte eine FXII-Defizienz bzw. FXIIa-Hemmung auch eine Reduktion der Thrombusbildung im geschädigten Hirngewebe ohne Erhöhung des intrazerebralen Blutungsrisikos (Hopp et al., 2016). Insofern ist der in der vorliegenden Studie getestete Wirkstoff C1-Inhibitor sehr interessant. Anders als die oben genannten Therapieansätze greift der C1-Inhibitor auf verschiedenen Ebenen an und hemmt sowohl FXIIa als auch Plasmakallikrein.

Die therapeutische Wirkung des C1-Inhibitors bei experimentellem SHT wurde bereits in einem „*Controlled cortical impact*“-Mausmodell untersucht (Longhi et al., 2008, 2009). Die Ergebnisse zeigen, dass eine Applikation von 15 IU C1-Inhibitor 10 Min. nach SHT sich neuroprotektiv auswirkte, zu kleineren

Hirnläsionen und weniger motorischen und kognitiven Einschränkungen führte. Eine Applikation des Wirkstoffs 1 Stunde nach SHT hatte keinen Einfluss auf die Hirnläsionsgröße und die kognitive Leistung; die motorischen Einschränkungen waren jedoch geringer. Unsere Experimente bestätigen, dass der C1-Inhibitor sich schützend nach experimentellem SHT auswirkt und zu signifikant kleineren Hirnläsionen führt. Anders als Longhi et al., untersuchten wir neben der Größe der Hirnläsion auch die BHS-Integrität, die Ausbildung eines Hirnödems und die Auswirkungen auf die Inflammation. Unsere Ergebnisse zeigen, dass eine Behandlung mit 15 IU C1-Inhibitor 1 Stunde nach Induktion einer fokalen Läsion zu einer Reduktion der BHS-Störung und des Hirnödems führt. Zudem wandern weniger Leukozyten in das geschädigte Hirnareal ein.

Nach SHT bilden sich Thromben aus, die zur Okklusion von Arteriolen und Venolen mit konsekutivem Perfusionsdefizit im perikontusionellen Gewebe durch progrediente Thrombusbildung führen können (Schwarzmaier et al., 2010; Hopp et al., 2016). Dies kann zu einer sekundären Ausweitung des Gewebeschadens führen. Der C1-Inhibitor könnte die Ausbildung der Thromben über verschiedenen Mechanismen hemmen. Zum einen hemmt er FXIIa und damit die intrinsische Gerinnung. Außerdem weist eine Studie darauf hin, dass der C1-Inhibitor die Thrombinaktivität an Endothelzellen durch Bindung an Selektin hemmt (Caccia et al., 2011). Daher untersuchten meine Kollegen und ich, ob die therapeutische Behandlung mit 15 IU C1-Inhibitor 1 Stunde nach Induktion einer fokalen Hirnläsion auch die Ausbildung dieser Thromben hemmt. Die Ergebnisse bestätigen diese Vermutung. Nach Behandlung mit C1-Inhibitor sind weniger Gefäße im Hirngewebe okkludiert und der Fibrin(ogen)gehalt deutet auf eine geringere thrombotische Aktivität im Vergleich zur Kontrollgruppe hin.

Der schützende Effekt einer C1-Inhibitor-Behandlung war im Kälteläsionsmodell auch noch 5 Tage nach Schädigung und in Tieren beiderlei Geschlechts sichtbar (Albert-Weissenberger et al., 2014). Insgesamt zeigen die Ergebnisse meiner Kollegen und mir als auch die vorangegangenen Studien von Longhi et

al. (2008, 2009), dass eine Behandlung mit C1-Inhibitor nach experimentellem SHT sich schützend auswirkt. Der C1-Inhibitor ist somit ein vielversprechender Wirkstoff zur therapeutischen Behandlung von SHT.

6 Zusammenfassung

Bei einem SHT handelt es sich um eine mechanische Schädigung des Hirngewebes, verursacht durch eine Gewalteinwirkung auf den Kopf. Diese initiale Schädigung des Hirngewebes weitet sich nachfolgend aus. Wirksame Therapien, um diese sekundären Pathomechanismen zu inhibieren, gibt es nicht. Sofern das SHT überlebt wird, ist es eine der häufigsten Ursachen für bleibende Behinderungen. Wichtige Pathomechanismen, welche zur Ausweitung der Hirnschädigung beitragen, sind das posttraumatische Hirnödem und Entzündungsreaktionen. Beides wird durch die Aktivierung des sogenannten Kallikrein-Kinin-Systems begünstigt. In der vorliegenden Arbeit wurde dieses System 1 Stunde nach experimentellem SHT durch die Applikation des C1-Inhibitors gehemmt und am nachfolgenden Tag die Auswirkungen bewertet. Die Ergebnisse zeigen, dass diese Behandlung nach der Hirnverletzung zu einer Reduktion des Hirnödems und der Entzündungsreaktion führt. Die Bildung von Thromben in den Hirngefäßen ist geringer als in Kontrolltieren, vermutlich da der C1-Inhibitor auch die intrinsische Gerinnungskaskade hemmt. Insgesamt führt die Behandlung zu kleineren Hirnläsionen als in entsprechenden Kontrolltieren. Hiermit stellt der C1-Inhibitor ein potenzieller Therapieansatz bei SHT dar. Jedoch bleibt es offen, inwiefern sich diese Ergebnisse auf das menschliche SHT übertragen lassen.

7 Literaturverzeichnis

1. Adams JH, Graham DI, Gennarelli TA, Maxwell WL. Diffuse axonal injury in non-missile head injury. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1991;54(6):481-483. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC488581/>.
2. Albert-Weissenberger C, Mencl S, Schuhmann MK, Salur I, Göb E, Langhauser F, Hopp S, Hennig N, Meuth SG, Nolte MW, Sirén AL, Kleinschnitz C. C1-Inhibitor protects from focal brain trauma in a cortical cryolesion mice model by reducing Thrombo-Inflammation. *Front Cell Neurosci*. 2014;8(SEP). doi:10.3389/fncel.2014.00269.
3. Albert-Weissenberger C, Mencl S, Hopp S, Kleinschnitz C, Sirén A-L. Role of the kallikrein-kinin system in traumatic brain injury. *Front Cell Neurosci*. 2014;8. doi:10.3389/fncel.2014.00345.
4. Albert-Weissenberger C, Sirén A-L. Experimental traumatic brain injury. *Exp Transl Stroke Med*. 2010;2(1):16. doi:10.1186/2040-7378-2-16.
5. Albert-Weißenberger C, Sirén A-L, Kleinschnitz C. Ischemic stroke and traumatic brain injury: The role of the kallikrein-kinin system. *Prog Neurobiol*. 2013;101-102:65-82. doi:10.1016/j.pneurobio.2012.11.004.
6. Albert-Weissenberger C, Stetter C, Meuth SG, et al. Blocking of Bradykinin Receptor B1 Protects from Focal Closed Head Injury in Mice by Reducing Axonal Damage and Astroglia Activation. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2012;32(9):1747-1756. doi:10.1038/jcbfm.2012.62.
7. Auer LM, Ott E. Disturbances of the coagulatory system in patients with severe cerebral trauma II. *Acta Neurochir*. 1979;49(3-4):219-226. doi:10.1007/bf01808961.
8. Austinat M, Braeuninger S, Pesquero JB, et al. Blockade of bradykinin receptor B1 but not bradykinin receptor B2 provides protection from cerebral

infarction and brain edema. *Stroke*. 2009;40(1):285-293. doi:10.1161/STROKEAHA.108.526673.

9. Baethmann A, Maier-Hauff K, Kempfski O, Unterberg A, Wahl M, Schürer L. Mediators of brain edema and secondary brain damage. *Crit Care Med*. 1988;16(10):972-978.

10. Barzó P, Marmarou A, Fatouros P, Hayasaki K, Corwin F. Biphasic pathophysiological response of vasogenic and cellular edema in traumatic brain swelling. *Acta Neurochir Suppl*. 1997;70:119-122.

11. Bederson JB, Pitts LH, Germano SM, Nishimura MC, Davis RL, Bartkowski HM. Evaluation of 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride as a stain for detection and quantification of experimental cerebral infarction in rats. *Stroke*. 1986;17(6):1304-1308.

12. Begieneman MP V, Kubat B, Ulrich MMW, et al. Prolonged C1 Inhibitor Administration Improves Local Healing of Burn Wounds and Reduces Myocardial Inflammation in a Rat Burn Wound Model. *J Burn Care Res*. 2012;33(4):544-551. doi:10.1097/bcr.0b013e31823bc2fc.

13. Björkqvist J, Jämsä A, Renné T. Plasma kallikrein: the bradykinin-producing enzyme. *Thromb Haemost*. 2013;110(3):399-407. doi:10.1160/th13-03-0258.

14. Blennow K, Hardy J, Zetterberg H. The Neuropathology and Neurobiology of Traumatic Brain Injury. *Neuron*. 2012;76(5):886-899. doi:10.1016/j.neuron.2012.11.021.

15. Brightman MW, Reese TS. Junctions between intimately apposed cell membranes in the vertebrate brain. *J Cell Biol*. 1969;40(3):648-677.

16. Caccia S, Castelli R, Maiocchi D, Bergamaschini L, Cugno M. Interaction of C1 inhibitor with thrombin on the endothelial surface. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 2011;22(7):571-575. doi:10.1097/mbc.0b013e3283494ba7.

17. Cai S, Davis AE. Complement Regulatory Protein C1 Inhibitor Binds to Selectins and Interferes with Endothelial-Leukocyte Adhesion. *J Immunol.* 2003;171(9):4786-4791. doi:10.4049/jimmunol.171.9.4786.
18. Caliezi C, Wullemin WA, Zeerleder S, Redondo M, Eisele B, Hack CE. C1-Esterase inhibitor: an anti-inflammatory agent and its potential use in the treatment of diseases other than hereditary angioedema. *Pharmacol Rev.* 2000;52(1):91-112.
19. Camargo ACM, Shapanka R, Greene LJ. Preparation, assay, and partial characterization of a neutral endopeptidase from rabbit brain. *Biochem (Mosc).* 1973;12(9):1838-1844. doi:10.1021/bi00733a028.
20. Cederberg D, Siesjö P. What has inflammation to do with traumatic brain injury? *Child's Nerv Syst.* 2009;26(2):221-226. doi:10.1007/s00381-009-1029-x.
21. Chakraborty S, Skolnick B, Narayan RK. Neuroprotection Trials in Traumatic Brain Injury. *Curr Neurol Neurosci Rep.* 2016;16(4). doi:10.1007/s11910-016-0625-x.
22. Chauhan NB. Chronic neurodegenerative consequences of traumatic brain injury. *Restor Neurol Neurosci.* 2014;32(2):337-365. doi:10.3233/RNN-130354.
23. Chodobski A, Zink BJ, Szmydynger-Chodobska J. Blood-Brain Barrier Pathophysiology in Traumatic Brain Injury. *Transl Stroke Res.* 2011;2(4):492-516. doi:10.1007/s12975-011-0125-x.
24. Cochrane CG, Griffin JH. The biochemistry and pathophysiology of the contact system of plasma. *Adv Immunol.* 1982;33:241-306.
25. Colman RW. The contact system: a proinflammatory pathway with antithrombotic activity. *Nat Med.* 1998;4(3):277-278.
26. Davis AE, Lu F, Mejia P. C1 inhibitor, a multi-functional serine protease inhibitor. *Thromb Haemost.* 2010;104(5):886-893. doi:10.1160/th10-01-0073.

27. Davis AE, Mejia P, Lu F. Biological activities of C1 inhibitor. *Mol Immunol*. 2008;45(16):4057-4063. doi:10.1016/j.molimm.2008.06.028.
28. Décarie A, Raymond P, Gervais N, Couture R, Adam A. Serum interspecies differences in metabolic pathways of bradykinin and [des-Arg9]BK: influence of enalaprilat. *Am J Physiol*. 1996;271(4 Pt 2):H1340-H1347.
29. Dickneite G. Influence of C1-inhibitor on inflammation, edema and shock. *Behring Inst Mitt*. 1993;(93):299-305.
30. Donkin JJ, Vink R. Mechanisms of cerebral edema in traumatic brain injury: therapeutic developments. *Curr Opin Neurol*. 2010;23(3):293-299. doi:10.1097/wco.0b013e328337f451.
31. Farace E, Alves WM. Do women fare worse: a metaanalysis of gender differences in traumatic brain injury outcome. *J Neurosurg*. 2000;93(4):539-545. doi:10.3171/jns.2000.93.4.0539.
32. Firsching R, Messing-Jünger M, Rickeis E, Gräber S, Schwerdtfeger K. Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Neurochirurgie: Schädel-Hirn-Trauma im Erwachsenenalter. 2015.
33. Furuse M, Hirase T, Itoh M, et al. Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions. *J Cell Biol*. 1993;123(6 Pt 2):1777-1788.
34. Furuse M, Fujita K, Hiiragi T, Fujimoto K, Tsukita S. Claudin-1 and -2: Novel Integral Membrane Proteins Localizing at Tight Junctions with No Sequence Similarity to Occludin. *J Cell Biol*. 1998;141(7):1539-1550. doi:10.1083/jcb.141.7.1539.
35. Göb E, Reymann S, Langhauser F, et al. Blocking of plasma kallikrein ameliorates stroke by reducing thromboinflammation. *Ann Neurol*. 2015;77(5):784-803. doi:10.1002/ana.24380.

36. Graham DI, Adams JH, Doyle D. Ischaemic brain damage in fatal non-missile head injuries. *J Neurol Sci.* 1978;39(2-3):213-234.
37. Graham DI, Ford I, Adams JH, et al. Ischaemic brain damage is still common in fatal non-missile head injury. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 1989;52(3):346-350.
38. Hawryluk GWJ, Bullock MR. Past, Present, and Future of Traumatic Brain Injury Research. *Neurosurg Clin N Am.* 2016;27(4):375-396. doi:10.1016/j.nec.2016.05.002.
39. Heydenreich N, Nolte MW, Gob E, et al. C1-Inhibitor Protects From Brain Ischemia-Reperfusion Injury by Combined Antiinflammatory and Antithrombotic Mechanisms. *Stroke.* 2012;43(9):2457-2467. doi:10.1161/strokeaha.112.660340.
40. Hill CS, Coleman MP, Menon DK. Traumatic Axonal Injury: Mechanisms and Translational Opportunities. *Trends Neurosci.* 2016;39(5):311-324. doi:10.1016/j.tins.2016.03.002.
41. Hopp S, Albert-Weissenberger C, Mencl S, et al. Targeting coagulation factor XII as a novel therapeutic option in brain trauma. *Ann Neurol.* 2016;79(6):970-982. doi:10.1002/ana.24655.
42. Hopp S, Nolte MW, Stetter C, Kleinschnitz C, Sirén A-L, Albert-Weissenberger C. Alleviation of secondary brain injury, posttraumatic inflammation, and brain edema formation by inhibition of factor XIIIa. *J Neuroinflammation.* 2017;14(1). doi:10.1186/s12974-017-0815-8.
43. Horstick G, Heimann A, Gotze O, et al. Intracoronary Application of C1 Esterase Inhibitor Improves Cardiac Function and Reduces Myocardial Necrosis in an Experimental Model of Ischemia and Reperfusion. *Circulation.* 1997;95(3):701-708. doi:10.1161/01.cir.95.3.701.

44. Igonin AA, Protsenko DN, Galstyan GM, et al. C1-esterase inhibitor infusion increases survival rates for patients with sepsis. *Crit Care Med*. 2012;40(3):770-777. doi:10.1097/ccm.0b013e318236edb8.
45. Ivashkova Y, Svetnitsky A, Mayzler O, et al. Bradykinin B2 receptor antagonism with LF 18-1505T reduces brain edema and improves neurological outcome after closed head trauma in rats. *J Trauma*. 2006;61(4):879-885. doi:10.1097/01.ta.0000234722.98537.01.
46. Johnson VE, Stewart W, Smith DH. Traumatic brain injury and amyloid- β pathology: a link to Alzheimer's disease? *Nat Rev Neurosci*. 2010. doi:10.1038/nrn2808.
47. Kariya K, Yamauchi A, Sasaki T. Regional Distribution and Characterization of Kinin in the CNS of the Rat. *J Neurochem*. 1985;44(6):1892-1897. doi:10.1111/j.1471-4159.1985.tb07185.x.
48. Keating GM. Human C1-Esterase Inhibitor Concentrate (Berinert®). *BioDrugs*. 2009;23(6):399-406. doi:10.2165/11201100-000000000-00000.
49. Ker K, Blackhall K. Beta-2 receptor antagonists for acute traumatic brain injury. *Cochrane database Syst Rev*. 2008;(1):CD006686. doi:10.1002/14651858.CD006686.pub2.
50. Kinoshita K. Traumatic brain injury: pathophysiology for neurocritical care. *J Intensive Care*. 2016;4(1). doi:10.1186/s40560-016-0138-3.
51. 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. doi:10.1016/0006-8993(94)91934-8.
52. 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. doi:10.1097/00005072-195810000-00002.

53. Kleinschnitz C, Grund H, Wingler K, et al. Post-Stroke Inhibition of Induced NADPH Oxidase Type 4 Prevents Oxidative Stress and Neurodegeneration. McLeod M, ed. *PLoS Biol.* 2010;8(9):e1000479. doi:10.1371/journal.Pbio.1000479.
54. Kunz M, Nussberger J, Holtmannspötter M, Bitterling H, Plesnila N, Zausinger S. Bradykinin in Blood and Cerebrospinal Fluid after Acute Cerebral Lesions: Correlations with Cerebral Edema and Intracranial Pressure. *J Neurotrauma.* 2013;30(19):1638-1644. doi:10.1089/neu.2012.2774.
55. Langhauser F, Gob E, Kraft P, et al. Kininogen deficiency protects from ischemic neurodegeneration in mice by reducing thrombosis, blood-brain barrier damage, and inflammation. *Blood.* 2012;120(19):4082-4092. doi:10.1182/blood-2012-06-440057.
56. Laskowitz DT, Song P, Wang H, et al. Traumatic Brain Injury Exacerbates Neurodegenerative Pathology: Improvement with an Apolipoprotein E-Based Therapeutic. *J Neurotrauma.* 2010;27(11):1983-1995. doi:10.1089/neu.2010.1396.
57. Laskowitz D, Grant G. Translational Research in Traumatic Brain Injury. 2016.
58. Leeb-Lundberg LMF, Marceau F, Müller-Esterl W, Pettibone DJ, Zuraw BL. International union of pharmacology. XLV. Classification of the kinin receptor family: from molecular mechanisms to pathophysiological consequences. *Pharmacol Rev.* 2005;57(1):27-77. doi:10.1124/pr.57.1.2.
59. Lehmann TG, Heger M, Münch S, Kirschfink M, Klar E. In vivo microscopy reveals that complement inhibition by C1-esterase inhibitor reduces ischemia/reperfusion injury in the liver. *Transpl Int.* 2000;13(S1):S547--S550. doi:10.1111/j.1432-2277.2000.tb02101.x.

60. Longhi L, Perego C, Zanier ER, et al. Neuroprotective effect of C1-inhibitor following traumatic brain injury in mice. In: *Acta Neurochir Suppl*. Springer Vienna; 2008:381-384. doi:10.1007/978-3-211-85578-2_73.
61. Longhi L, Perego C, Ortolano F, et al. C1-inhibitor attenuates neuro-behavioral deficits and reduces contusion volume after controlled cortical impact brain injury in mice. *Crit Care Med*. 2009;37(2):659-665. doi:10.1097/ccm.0b013e318195998a.
62. Lucas S-M, Rothwell NJ, Gibson RM. The role of inflammation in {CNS} injury and disease. *Br J Pharmacol*. 2009;147(S1):S232-S240. doi:10.1038/sj.bjp.0706400.
63. Maas A. Traumatic brain injury: Changing concepts and approaches. *Chin J Traumatol*. 2016;19(1):3-6. doi:10.1016/j.cjtee.2016.01.001.
64. Maas AIR, Dearden M, Servadei F, Stocchetti N, Unterberg A. Current recommendations for neurotrauma. *Curr Opin Crit Care*. 2000;6(4):281-292.
65. Maas AIR, Menon DK, Steyerberg EW, et al. Collaborative European NeuroTrauma Effectiveness Research in Traumatic Brain Injury (CENTER-TBI): a prospective longitudinal observational study. *Neurosurgery*. 2015;76(1):67-80. doi:10.1227/NEU.0000000000000575.
66. Marceau F, Regoli D. Bradykinin receptor ligands: therapeutic perspectives. *Nat Rev Drug Discov*. 2004;3(10):845-852. doi:10.1038/nrd1522.
67. Marklund N, Hillered L. Animal modelling of traumatic brain injury in preclinical drug development: where do we go from here? *Br J Pharmacol*. 2011;164(4):1207-1229. doi:10.1111/j.1476-5381.2010.01163.x.
68. Marmarou A, Signoretti S, Fatouros PP, Portella G, Aygok GA, Bullock MR. Predominance of cellular edema in traumatic brain swelling in patients with severe head injuries. *J Neurosurg*. 2006;104(5):720-730. doi:10.3171/jns.2006.104.5.720.

69. Martinez-Saguer I, Cicardi M, Suffritti C, et al. Pharmacokinetics of plasma-derived C1-esterase inhibitor after subcutaneous versus intravenous administration in subjects with mild or moderate hereditary angioedema: the PASSION study. *Transfus*. 2013;54(6):1552-1561. doi:10.1111/trf.12501.
70. Masel BE, DeWitt DS. Traumatic brain injury: a disease process, not an event. *J Neurotrauma*. 2010;27(8):1529-1540. doi:10.1089/neu.2010.1358.
71. Mejia P, Davis AE. C1 Inhibitor Suppresses the Endotoxic Activity of a Wide Range of Lipopolysaccharides and Interacts With Live Gram-negative Bacteria. *Shock*. 2012;38(2):220-225. doi:10.1097/shk.0b013e31825bf40e.
72. Mencl S, Hennig N, Hopp S, et al. FTY720 does not protect from traumatic brain injury in mice despite reducing posttraumatic inflammation. *J Neuroimmunol*. 2014;274(1-2):125-131. doi:10.1016/j.jneuroim.2014.07.010.
73. Mendelow AD, Teasdale GM. Pathophysiology of head injuries. *Br J Surg*. 1983;70(11):641-650. doi:10.1002/bjs.1800701102.
74. MERYMAN HT. Mechanics of freezing in living cells and tissues. *Science*. 1956;124(3221):515-521.
75. Mokri B. The Monro-Kellie hypothesis: applications in CSF volume depletion. *Neurology*. 2001;56(12):1746-1748.
76. Morganti-Kossmann MC, Rancan M, Stahel PF, Kossmann T. Inflammatory response in acute traumatic brain injury: a double-edged sword. *Curr Opin Crit Care*. 2002;8(2):101-105. doi:10.1097/00075198-200204000-00002.
77. Obermeier B, Daneman R, Ransohoff RM. Development, maintenance and disruption of the blood-brain barrier. *Nat Med*. 2013;19(12):1584-1596. doi:10.1038/nm.3407.

78. Park CH, Choi SH, Piao Y, et al. Glutamate and aspartate impair memory retention and damage hypothalamic neurons in adult mice. *Toxicol Lett.* 2000; 115(2):117-125.
79. Peeters W, van den Brande R, Polinder S, et al. Epidemiology of traumatic brain injury in Europe. *Acta Neurochir.* 2015;157(10):1683-1696. doi:10.1007/s00701-015-2512-7.
80. Price L Wilson C GG. Blood–Brain Barrier Pathophysiology following Traumatic Brain Injury. In: CRC Press/Taylor and Francis Group; 2016. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK326726/>.
81. Pruneau D, Chorny I, Benkovitz V, Artru A, Roitblat L, Shapira Y. 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. doi:10.1089/neu.1999.16.1057.
82. Raslan F, Albert-Weißenberger C, Ernestus R-I, Kleinschnitz C, Siren A-L. Focal brain trauma in the cryogenic lesion model in mice. *Exp Transl Stroke Med.* 2012;4(1):6. doi:10.1186/2040-7378-4-6.
83. Raslan F, Schwarz T, Meuth SG, et al. Inhibition of Bradykinin Receptor B1 Protects Mice from Focal Brain Injury by Reducing Blood-Brain Barrier Leakage and Inflammation. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2010;30(8):1477-1486. doi:10.1038/jcbfm.2010.28.
84. Ratcliff JJ, Greenspan AI, Goldstein FC, et al. Gender and traumatic brain injury: Do the sexes fare differently? *Brain Inj.* 2007;21(10):1023-1030. doi:10.1080/02699050701633072.
85. Reese TS, Karnovsky MJ. Fine structural localization of a blood-brain barrier to exogenous peroxidase. *J Cell Biol.* 1967;34(1):207-217.
86. Renné T. The procoagulant and proinflammatory plasma contact system. *Semin Immunopathol.* 2011;34(1):31-41. doi:10.1007/s00281-011-0288-2.

87. Rickels E, von Wild K, Wenzlaff P. Head injury in Germany: a population-based prospective study on epidemiology, causes, treatment and outcome of all degrees of head-injury severity in two distinct areas. *Brain Inj.* 2010; 24(12):1491-1504.
88. Roozenbeek B, Maas AIR, Menon DK. Changing patterns in the epidemiology of traumatic brain injury. *Nat Rev Neurol.* 2013;9(4):231-236. doi:10.1038/nrneurol.2013.22.
89. Rosenberg GA, Yang Y. Vasogenic edema due to tight junction disruption by matrix metalloproteinases in cerebral ischemia. *Neurosurg Focus.* 2007; 22(5): E4.
90. Salehi A, Zhang JH, Obenaus A. Response of the cerebral vasculature following traumatic brain injury. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2017;37(7):2320-2339. doi:10.1177/0271678x17701460.
91. Schoenfeld A-K, Lahrsen E, Alban S. Regulation of Complement and Contact System Activation via C1 Inhibitor Potentiation and Factor XIIIa Activity Modulation by Sulfated Glycans Structure-Activity Relationships. Clark SJ, ed. *PLOS ONE.* 2016;11(10):e0165493. doi:10.1371/journal.pone.0165493.
92. Schwarzmaier SM, Kim S-W, Trabold R, Plesnila N. Temporal Profile of Thrombogenesis in the Cerebral Microcirculation after Traumatic Brain Injury in Mice. *J Neurotrauma.* 2010;27(1):121-130. doi:10.1089/neu.2009.1114.
93. Schwarzmaier SM, Plesnila N. Contributions of the immune system to the pathophysiology of traumatic brain injury - evidence by intravital microscopy. *Front Cell Neurosci.* 2014;8. doi:10.3389/fncel.2014.00358.
94. Shlosberg D, Benifla M, Kaufer D, Friedman A. Blood-brain barrier breakdown as a therapeutic target in traumatic brain injury. *Nat Rev Neurol.* 2010;6(7):393-403. doi:10.1038/nrneurol.2010.74.

95. Simon DW, McGeachy MJ, Baylir H, Clark RSB, Loane DJ, Kochanek PM. The far-reaching scope of neuroinflammation after traumatic brain injury. *Nat Rev Neurol*. 2017;13(3):171-191. doi:10.1038/nrneurol.2017.13.
96. Smith BJ. SDS polyacrylamide gel electrophoresis of proteins. *Methods Mol Biol*. 1994;32:23-34. doi:10.1385/0-89603-268-X:23.
97. Stahel PF, Shohami E, Younis FM, et al. Experimental closed head injury: analysis of neurological outcome, blood-brain barrier dysfunction, intracranial neutrophil infiltration, and neuronal cell death in mice deficient in genes for pro-inflammatory cytokines. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2000;20(2):369-380. doi:10.1097/00004647-200002000-00019.
98. Stocchetti N, Carbonara M, Citerio G, et al. Severe traumatic brain injury: targeted management in the intensive care unit. *Lancet Neurol*. 2017;16(6):452-464. doi:10.1016/s1474-4422(17)30118-7.
99. Storini C, Rossi E, Marrella V, et al. C1-inhibitor protects against brain ischemia-reperfusion injury via inhibition of cell recruitment and inflammation. *Neurobiol Dis*. 2005;19(1-2):10-17. doi:10.1016/j.nbd.2004.11.001.
100. Teasdale G, Maas A, Lecky F, Manley G, Stocchetti N, Murray G. The Glasgow Coma Scale at 40 years: standing the test of time. *Lancet Neurol*. 2014;13(8):844-854. doi:10.1016/s1474-4422(14)70120-6.
101. Tei R, Kaido T, Nakase H, Sakaki T. Protective effect of C1 esterase inhibitor on acute traumatic spinal cord injury in the rat. *Neurol Res*. 2008;30(7):761-767. doi:10.1179/174313208x284241.
102. Trabold R, Erös C, Zweckberger K, et al. The Role of Bradykinin B1 and B2 Receptors for Secondary Brain Damage after Traumatic Brain Injury in Mice. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2009;30(1):130-139. doi:10.1038/jcbfm.2009.196.

103. Unterberg AW, Stover J, Kress B, Kiening KL. Edema and brain trauma. *Neuroscience*. 2004;129(4):1021-1029. doi:10.1016/j.neuroscience.2004.06.046.
104. Unterberg AW, Stroop R, Thomale UW, Kiening KL, Päuser S, Vollmann W. Characterisation of brain edema following “controlled cortical impact injury” in rats. *Acta Neurochir Suppl*. 1997;70:106-108.
105. Unterberg A, Dautermann C, Baethmann A, Müller-Esterl W. The kallikrein-kinin system as mediator in vasogenic brain edema. *J Neurosurg*. 1986;64(2):269-276. doi:10.3171/jns.1986.64.2.0269.
106. Wagner AK, Fabio A, Puccio AM, et al. Gender associations with cerebrospinal fluid glutamate and lactate/pyruvate levels after severe traumatic brain injury. *Crit Care Med*. 2005;33(2):407-413. doi:10.1097/01.ccm.0000153931.23488.dd.
107. 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. doi:10.1038/jcbfm.1988.109.
108. Washington PM, Villapol S, Burns MP. Polypathology and dementia after brain trauma: Does brain injury trigger distinct neurodegenerative diseases, or should they be classified together as traumatic encephalopathy? *Exp Neurol*. 2016;275:381-388. doi:10.1016/j.expneurol.2015.06.015.
109. Werner C, Engelhard K. Pathophysiology of traumatic brain injury. *Br J Anaesth*. 2007;99(1):4-9. doi:10.1093/bja/aem131.
110. Wheaton P, Mathias JL, Vink R. Impact of Early Pharmacological Treatment on Cognitive and Behavioral Outcome After Traumatic Brain Injury in Adults. *J Clin Psychopharmacol*. 2009;29(5):468-477. doi:10.1097/jcp.0b013e3181b66f04.

111. Wilson L, Stewart W, Dams-O'Connor K, et al. The chronic and evolving neurological consequences of traumatic brain injury. *Lancet Neurol*. 2017;16(10):813-825. doi:10.1016/s1474-4422(17)30279-x.

112. Wolman M, Klatzo I, Chui E, et al. Evaluation of the dye-protein tracers in pathophysiology of the blood-brain barrier. *Acta Neuropathol (Berl)*. 1981; 54(1):55-61.

113. Zweckberger K, Plesnila N. Anatibant, a selective non-peptide bradykinin B2 receptor antagonist, reduces intracranial hypertension and histopathological damage after experimental traumatic brain injury. *Neurosci Lett*. 2009;454(2): 115-117. doi:10.1016/j.neulet.2009.02.014.

8 Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1 Schematische Darstellung der BHS und neurovaskulären Unit
- Abb. 2 Darstellung sekundärer Hirnschäden nach SHT
- Abb. 3 Schematische Darstellung des Kontakt-Kinin-Systems
- Abb. 4 Stereotaxie-Gerät zur Drei-Punkt-Fixierung des Kopfes mit Kupferhohlzylinder zur Applikation der Kälteläsion
- Abb. 5 Drei-Punkt-Fixierung des Kopfes in der stereotaktischen Halterung sowie Präparation der Kopfhaut
- Abb. 6 Koordinaten der Läsionsstelle
- Abb. 7 Kältesonde zur Applikation der Kälteläsion
- Abb. 8 Applikation der Kälteläsion
- Abb. 9 Nach Behandlung mit 15 IU C1-Inhibitor zeigte sich ein deutlich reduziertes Läsionsvolumen im Vergleich zur Kontrollgruppe
- Abb. 10 Repräsentative TTC-Färbungen der coronaren Hirnschnitte mit und ohne 15 IU C1-Inhibitor
- Abb. 11 Stabilisierung der BHS und Reduktion der Hirnödembildung nach Behandlung mit 15 IU C1-Inhibitor
- Abb. 12 Relative Proteinexpression von Claudin-5 im ipsilateralen Cortex von mit 15 IU C1-Inhibitor-behandelten Mäusen im Vergleich zur Kontrollgruppe
- Abb. 13 Repräsentative immunhistochemische Makrophagen-Färbungen mit CD11b-positiven Zellen
- Abb. 14 Repräsentative immunhistochemische Färbungen von Neutrophilen

- Abb. 15 Akkumulation von Fibrin(ogen) im ipsilateralen und kontralateralen Kortex von unbehandelten und mit 15 IU C1-Inh.-behandelten Mäusen
- Abb. 16 Hämalaun-Eosin-Färbung: Nachweis von Gefäßokklusionen durch thrombotisches Material in unbehandelten Kryoschnitten
- Abb. 17 Die Behandlung mit C1-Inhibitor führt zur signifikant weniger Thrombusbildung in Gefäßen

Danksagung

An dieser Stelle möchte mich bei denjenigen bedanken, die mich in dieser herausfordernden Phase begleitet und unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Anna Leena Sirén und Frau Dr. rer. nat. Christiane Albert-Weißberger für die Vergabe dieses interessanten Promotionsthemas und ihre kontinuierliche Unterstützung, Betreuung und Hilfsbereitschaft während der Erstellung dieser Dissertation. Auch für die mühevollen Arbeit des Korrekturlesens möchte ich mich herzlich bedanken.

Besonders möchte ich an dieser Stelle auch meinen Eltern für ihre unermüdliche Geduld und Unterstützung danken.