

**Aus der Neurochirurgischen Klinik der Universität
Würzburg**

Direktor: Prof. Dr. med. R.-I. Ernestus

**Pathomechanismen und Therapie der Kallikrein-Kinin-
System vermittelten Hirnödembildung nach Neurotrauma**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde

der Medizinischen Fakultät der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Furat Raslan

Würzburg, Juni 2011

Referentin: Professorin Dr. Anna-Leena Sirén

Koreferentin: Professorin Dr. med. Claudia Sommer

Dekan: Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 25. Mai 2012

Der Promovend ist Arzt

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	1
2. Material und Methoden.....	14
2.1 Versuchstiere.....	14
2.2 Versuchsablauf und Tiermodell.....	15
2.3 Bestimmung des Läsionsvolumen	20
2.4 Bestimmung des vasogenen Hirnödems.....	21
2.5 Expressionsanalyse von Entzündungsmediatoren und Bradykininrezeptoren auf mRNA-Ebene mittels Real Time Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)	22
2.6 Histologie und Immunhistochemie.....	23
2.7 Statistik.....	24
2.8 Versuchsgruppen.....	25
2.9 Ausschlußkriterien.....	27
3. Ergebnisse.....	28
3.1 Lokaler Befund beim Versuchstier.....	28
3.2 Posttraumatische relative Genexpression der B1R und B2R zu unterschiedlichen Zeiten... ..	28
3.3 Läsionsvolumen in den B1R- und B2R-KO-Tieren.....	30
3.4 Läsionsvolumen nach Vor- oder Nachbehandlung mit Bradykinin-Rezeptor- Antagonisten.....	32
3.5 Bestimmung des vasogenen Hirnödems nach dem Trauma.....	35
3.6 Genexpressionsanalysen mittels quantitativer RT-PCR.....	37
3.7 Immunhistochemie.....	44
4. Diskussion.....	46
5. Abbildungsverzeichnis.....	54
6. Literaturverzeichnis.....	55

1 Einleitung

1.1 Hintergrund, Inzidenz und Pathophysiologie des Schädelhirntraumas

Das Schädel-Hirn-Trauma (SHT) bleibt trotz ständiger Verbesserungen der diagnostischen und therapeutischen Maßnahmen im intensivmedizinischen Bereich eine der häufigsten Ursachen für Tod und Behinderung bei jungen Erwachsenen (Greve et al. 2009, Gentry et al. 1994). Allein in Deutschland kam es in einem Jahr zu 248.000 Schädel-Hirn-Traumen aller Schweregrade, an denen 2.750 Patienten verstarben. Wenn man von 82 Millionen Einwohnern der Bundesrepublik Deutschland ausgeht, ergibt sich eine Inzidenz des SHT's von 332 Fällen pro 100.000 Einwohner (Rickels et al. 2006).

Abhängig von der Art und Stärke der einwirkenden Kraft kommt es bei Kopftrauma zu Verletzungen der Kopfschwarte, des knöchernen Schädels, der Hirnsubstanz oder zu Hirnblutungen. In der Regel sind es Kombinationen dieser Verletzungen. Diesbezüglich waren in einem Jahr in Deutschland 91% der Fälle als leichtes, 4% als mittelschweres und 5% als schweres SHT einzustufen (Rickels et al. 2006).

Die hohe sozioökonomische Bedeutung des schweren SHT's wird deutlicher, wenn man beachtet, dass 40% der schwerverletzten Patienten an den Traumafolgen versterben und weitere 40% mit moderaten bis schweren Behinderungen leben müssen (Murray et al. 1999). Dazu betragen die hochgerechneten gesamtgesellschaftlichen Kosten für das SHT im Jahr 2006 in Deutschland ca. 2,8 Milliarden €/Jahr (Rickels et al. 2006).

Die schlechte klinische Prognose und die Mortalität des schweren SHT's hängen nicht nur von den unmittelbar nach dem Trauma entstehenden zerebralen Hirnschäden ab, sondern auch von den sekundären Hirnschäden, die durch verschiedene Mechanismen entstehen, nicht zuletzt durch ein posttraumatisches Hirnödem (Teasdale et al. 1998).

Daher können die posttraumatischen Schäden in zwei Arten unterteilt werden:

•**Der primäre irreversible Hirnschaden** entsteht unmittelbar nach dem Trauma entsteht. Unter den primären Schäden lassen sich die sofortigen Folgen einer direkten Gewalteinwirkung, fokal (Kontusion, Hämatom, lokale Gewalteinwirkung) oder diffus (diffuse Blutung, Zug- bzw. Scherkräfte, diffuse axonale Schädigung) zusammenfassen (Adams et al. 1984). Die diffuse axonale Schädigung entsteht in der weißen Substanz durch Dehnung und Zerreißen von Nervenaxonen. Meistens besteht eine Kombination aus fokalen und diffusen Verletzungen (Povlishock et al. 1995, Adams et al. 1977). Die Verletzung von Hirngefäßen kann eine direkte Blutung nach dem Trauma sowie eine spätere Blutung bewirken (Baethmann et al. 1992, Baethmann et al. 1988).

•**Der sekundäre Hirnschaden** entsteht durch das Fortschreiten der funktionellen und strukturellen Zellschädigung, u.a. infolge eines Hirnödems, und führt zu einer weiteren Verschlechterung der Prognose.

Beim SHT kommt es als Folge der Hirnschädigung direkt zu einer Hirnläsion, welche als primäre Hirnparenchymläsion bezeichnet wird und irreversibel ist. Um diese Läsion treten eine Schwellung und ein Ödem auf, welche raumfordernd auf das gesunde Hirngewebe in der Läsionsumgebung wirken. Die Folge ist eine sekundäre Schädigung mit Zerstörung weiteren gesunden Hirngewebes. Zunächst kommt es zu einer lokalen Beeinträchtigung der Hirndurchblutung und der Sauerstoffversorgung. Bei einer weiteren Zunahme des raumfordernden Hirnödems im knöchern begrenzten Schädel entsteht letztendlich eine globale Funktionsstörung des Zentralnervensystems bis hin zur Einklemmung. Diese kann zu einer vitalen Bedrohung für den Patienten führen.

Eine raumfordernde traumatische intrakranielle Blutung kann ebenfalls einen Anstieg des intrakraniellen Drucks mit Reduktion des zerebralen Perfusionsdrucks verursachen. Dies wiederum führt zu Ischämie, Zunahme des Hirnödems und letztendlich zur Herniation des geschwellenen Hirns in den Tentoriumschlitz oder in das Foramen magnum (Baethmann et al. 1988, Povlishock et al. 2000, Povlishock & Jenkins LW 1995).

Außer den genannten intrakraniellen Mechanismen, die von großer Bedeutung für die Entstehung von sekundären Hirnschäden sind, tragen extrakranielle Faktoren, wie eine systemische Hypoxie und eine arterielle Hypotonie, wesentlich zur Entstehung von sekundären Hirnschäden bei (Chesnut et al. 1993, Piek et al. 1992).

Im Rahmen neuropathologischer Untersuchungen wurden bei 88-92% der an einem schweren SHT verstorbenen Patienten sekundäre Hirnschäden, wie Hypoxie- und Ischämiefolgen, im Hirnparenchym beobachtet (Graham et al. 1978, Graham et al. 1989). In Anbetracht dieser Kenntnisse wird deutlich, wie die Prognose im Allgemeinen und die Rehabilitation der Traumapatienten insbesondere durch die Reduktion des sekundären Hirnschadens maßgeblich beeinflusst werden kann.

Die traumatischen Primärhirnschäden sind irreversibel und damit nicht therapierbar. Deswegen wächst das Interesse an der klinischen und präklinischen Forschung zur Therapie des sich sekundär entwickelnden Hirnödems, durch die eine Schadensbegrenzung ermöglicht werden kann (Beathmann et al. 1980, Rosenberg et al. 2007, Liang et al. 2007, Kawamata et al. 2007).

Die Zunahme des Läsionsvolumens im Hirngewebe entspricht der typischen Entwicklung des Sekundärschadens (z.B. Hirnödem) nach einer umschriebenen traumatischen Hirnläsion. Diese führt wiederum zu Verstärkung des raumfordernden Hirnödems im Sinne eines „Circulus vitiosus“ (Eriskat et al. 1994).

Zahlreiche experimentelle Arbeiten beschäftigten sich mit der Entstehung von sekundären Hirnschäden und entdeckten dabei verschiedene molekulare Mechanismen bzw. Mediatoren, die die Entstehung des Hirnödems unterstützen und später zur Verstärkung desselben führen. Wenn man einen oder mehrere dieser Mediatoren bzw. Mechanismen antagonisieren würde, könnte dies zu einer deutlichen Abschwächung des Hirnödems führen. Die wichtigsten dieser Mechanismen oder Mediatoren sind Lactatazidose, Ödembildung, Calcium-Einstrom in die Nervenzellen, Freisetzung bestimmter Neurotransmitter wie Glutamat, Arachidonsäure, Entstehung von Stickstoffmonoxid, Bildung von freien Radikalen, Lipidperoxidation, Aktivierung der Komplementkaskade, Freisetzung von Zytokinen, Makrophagen-Infiltration und Freisetzung von Bradykinin (Maas et al. 2000, Unterberg et al. 1984, Park et al. 2000).

Des Weiteren spielt die Entwicklung des Hirnödems eine Schlüsselrolle bei der Entwicklung des Sekundärschadens. Bevor eine bestimmte Therapie des posttraumatischen Hirnödems diskutiert wird, ist das Verständnis der pathophysiologischen Grundlagen der Hirnödementwicklung unabdingbar.

1.2 Hirnödem

Nach pathophysiologischen und biomechanischen Kriterien kann das posttraumatisch entstehende Hirnödem in das extrazelluläre und das intrazelluläre Hirnödem unterteilt werden (Barzó et al. 1997, Klatzo et al. 1987, Kuroiwa et al. 1994, Marmarou et al. 1994).

1.2.1 Extrazelluläres Hirnödem

Das extrazelluläre oder auch vasogene Hirnödem entsteht durch eine gesteigerte Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke. Die Folge ist der Austritt von Flüssigkeit aus den Gefäßen in den extrazellulären Bereich (Mendelow et al. 1983).

1.2.2 Intrazelluläres Hirnödem

Das intrazelluläre Hirnödem wird in das zytotoxische und das neurotoxische Hirnödem unterteilt.

1.2.2.1 Zytotoxisches Hirnödem

Primär spielt die Störung des Elektrolytgleichgewichtes bei der Entstehung des zytotoxischen Hirnödems eine zentrale Rolle. Hierbei strömt extrazelluläres Na^+ , Cl^- und Wasser in die Zellen. Dies entsteht durch die Störung des Zellstoffwechsels und die damit verbundenen Funktionsstörung der in der glialen, neuronalen und endothelialen Zellmembran lokalisierten Na^+/K^+ -ATPase. Die Störung des Elektrolytgleichgewichtes kann in unterschiedlicher Ausprägung und Geschwindigkeit auftreten, wobei es neben einer vermehrten intrazellulären Na^+ - und Wasserretention zu einer extrazellulären Akkumulation von Kalium kommt. Das Ausmaß solcher Vorgänge

hängt von der Schwere des Primärschadens und der Begleitumstände, wie z. B. Hypoxie, Schockzustand oder Hypoglykämie, ab (Takahashi et al. 1981, Katayama et al. 1990).

1.2.2.2 Neurotoxisches Hirnödem

Eine massive Freisetzung von Glutamat im kontusionierten Hirngewebe führt zu einer Zellschwellung, die als neurotoxisches Hirnödem bezeichnet wird. Eine Zusammenfassung der Pathophysiologie der Entwicklung des Hirnödems wird in der Abbildung 1 dargestellt (Bhoola et al. 1987).

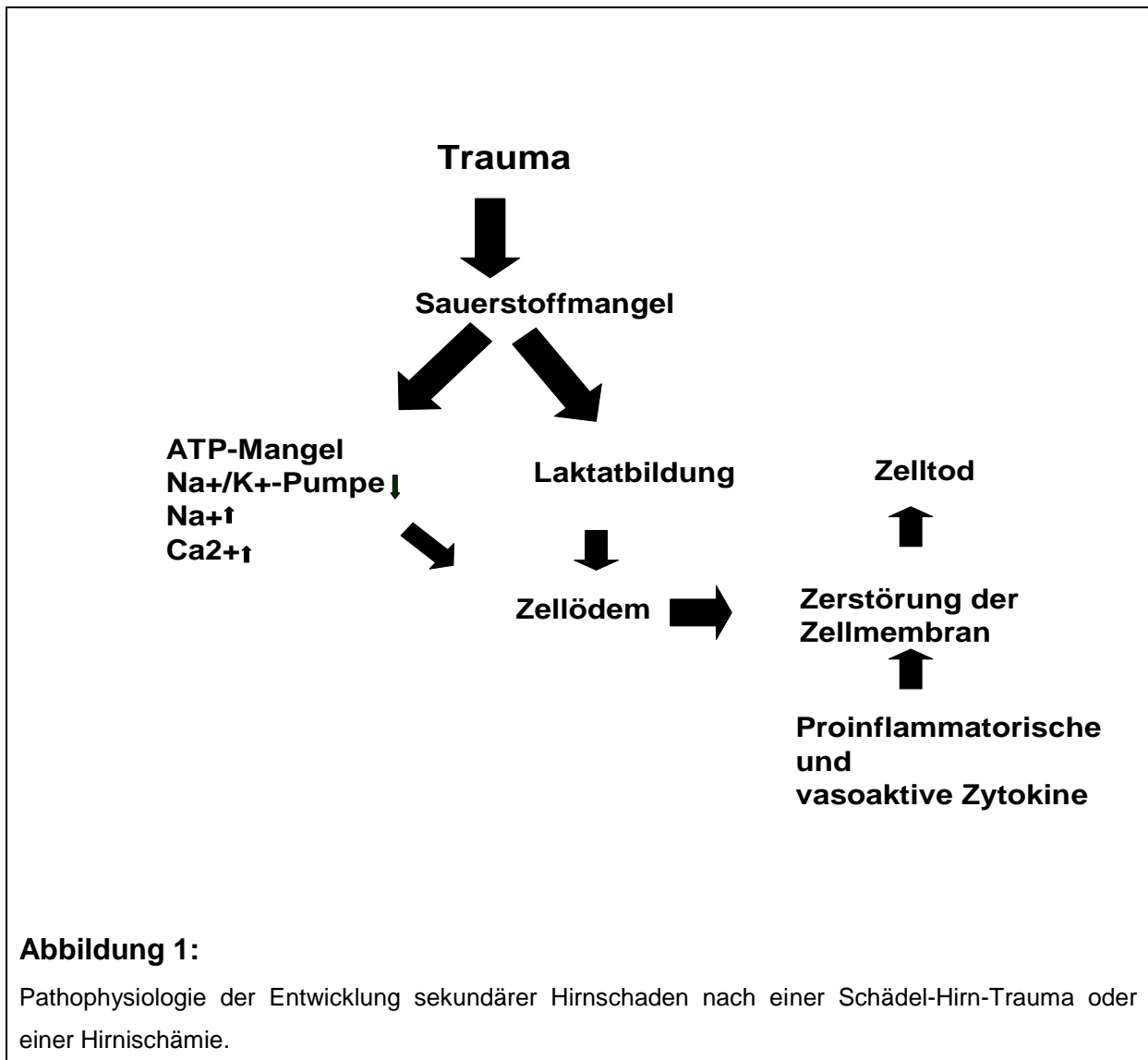


Abbildung 1:

Pathophysiologie der Entwicklung sekundärer Hirnschaden nach einer Schädel-Hirn-Trauma oder einer Hirnischämie.

Obwohl beide Varianten (extrazellulär und intrazellulär) meist gemeinsam und in unterschiedlichem Ausmaß auftreten, bildet das vasogene Ödem durch die Störung der Blut-Hirn-Schranke nach einem SHT zumindest initial die Hauptkomponente. Nach einer zerebralen Ischämie dominieren dagegen das zytotoxische und das neurotoxische Hirnödeme (Kimmelberg et al. 1995).

Um den intrakraniellen Druck konstant zu halten, soll das intrakranielle Gesamtvolumen nach der Monro-Kellie-Hypothese durch die Summe der drei Komponenten Gehirnparenchym, zerebrales Blutvolumen und Liquor cerebrospinalis stets gleich bleiben. Kommt es zu einer Zunahme eines der drei Kompartimente, kann der Druck durch die Abnahme eines anderen Kompartiments konstant gehalten werden. Bis zu einem gewissen Grad können so Veränderungen des intrakraniellen Volumens ausgeglichen werden. Sobald diese Ausgleichsreserve aufgebraucht ist, steigt der Hirndruck rapide an und führt zu einer Einklemmung des Hirnstamms in den Tentoriumschlitz oder in das Foramen magnum (Mokri et al. 2001, Neff et al. 1996, Stern et al. 1963). In ähnlicher Weise reagieren die intrakraniellen Kompartimente auf pathologische Raumforderungen im Gehirn. Diese können zunächst durch Verdrängen von Liquor (je nach Alter 40–80 ml Liquor) und Blut kompensiert werden. Wenn die Kompensationskapazität ausgeschöpft ist, steigt in der starren Schädelkapsel der intrakranielle Druck (ICP) stark an (Mumenthaler et al. 2001).

Die bislang etablierte intensivmedizinische Therapie zur Reduktion des posttraumatischen intrakraniellen Drucks beinhaltet Oberkörperhochlagerung bis 30°, moderate Hyperventilation, Hypothermie, Infusion hyperosmolarer Lösungen, Vasopressoren zur Erhöhung des cerebralen Perfusionsdrucks (CPP), Verbesserung der Sauerstoffversorgung des Hirngewebes, Barbiturat-Therapie sowie eine Dekompressionstrepation. Diese rein symptomatische Behandlung blieb als Standardtherapie zur Behandlung des erhöhten intrakraniellen Drucks infolge eines traumatischen Hirnödems seit Jahrzehnten weitgehend unverändert (Bullock et al. 1995a, Povlishock et al. 1992). Daher gewinnt die Suche nach ursachenbezogenen therapeutischen Ansätzen des posttraumatischen Hirnödems, wie z. B. die Behandlung mit Kininantagonisten, eine besondere Bedeutung.

Nach einem SHT spielt die Permeabilitätsstörung der Blut-Hirn-Schranke eine bedeutende Rolle bei der Entstehung und der Entwicklung des posttraumatischen vasogenen Hirnödems. Damit trägt dieser Prozess zum Anstieg des intrakraniellen Drucks bei. Die einzelnen Mechanismen, die für die Störung der Blut-Hirn-Schranke verantwortlich sind, sind nur ansatzweise bekannt.

Zahlreiche Untersuchungen belegen die Beteiligung des Bradykinins, ein aktiver Metabolit des Kallikrein-Kinin-Systems, an der Regulation der Blut-Hirn-Schranke nach einem Hirntrauma (Maier-Hauff et al. 1984, Toda et al. 1977, Unterberg et al. 1986). Zum Verständnis der pathophysiologischen posttraumatischen Mediatorenfunktion des Kallikrein-Kinin-Systems bei der Entstehung und der Entwicklung des Hirnödems wird zunächst die Funktion dieses Systems unter physiologischen Bedingungen erläutert.

1.3 Das Kallikrein-Kinin-System

Beim Kallikrein-Kinin-System handelt sich um ein ubiquitäres System mit Beteiligung an der Erweiterung der Gefäße, Erhöhung der Kapillarpermeabilität sowie Förderung der Leukozytenmigration und Spermatozoenmotilität. Außerdem verstärken Kinine die Produktion von Prostaglandinen und erhöhen über eine Durchblutungssteigerung die Glukoseverwertung des arbeitenden Muskels. Durch limitierte Proteolyse werden Kinine aus dem Kininogen vermittelt durch den Einfluß von Kallikrein freigesetzt. Die Wirkung dieses Systems setzt im Organismus nach Aktivierung schnell ein, sie ist aber nur von kurzer Dauer. Für das Kallikrein-Kinin-System stellt das Bradykinin die zentrale Wirksubstanz dar (Erdös et al. 1979, Carretero et al. 1980, Bönner et al. 1985).

Bereits 1909 wurde von Abelous und Bardier festgestellt, dass die i.v. Verabreichung einer aus dem menschlichen Urin isolierten Substanz zu einer Senkung des Blutdrucks bei Hunden führt (Abelous et al. 1909). Nach einer genaueren Funktionsanalyse durch Frey und Kraut 1926 wurde diese Substanz aufgrund ihrer Wirkung auf die Blutgefäße als Kreislaufhormon bezeichnet (Frey 1926, Frey and Kraut 1928). Nach Identifizierung weiterer Peptide mit ähnlichen Eigenschaften wurde diese Gruppe von Wirkstoffen als Kinine klassifiziert (Schachter and Thain 1954).

1.3.1 Kininsynthese und Wirkung im zentralen Nervensystem

Bradykinin und sein Derivat des-Arg-Bradykinin wurden mit ihren pharmakologischen Eigenschaften in unterschiedlichen Geweben von Regoli 1980 beschrieben. Die pathophysiologische Wirkung der Kinine wird größtenteils durch das Bradykinin (Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg) und sein Derivat des-Arg⁹-Bradykinin sowie das Kallidin vermittelt (Regoli et al. 1980).

Nach einer Gewebsschädigung, z.B. durch ein Trauma, eine Ischämie oder eine Noxenwirkung, wird Bradykinin freigesetzt. Dieses unterstützt seinerseits diverse pathophysiologische Vorgänge, wie z.B. eine Erhöhung der Gefäßpermeabilität, und dadurch die Entstehung von Ödemen sowie Prozesse der akuten Entzündung und der Schmerzwahrnehmung (Bhoola et al. 1992).

Das Kallikrein-Kinin-System bei Säugetieren kann sowohl auf Plasmaebene als auch im Gewebebereich aktiviert werden. Der Auslöser der Aktivierungskette des Kallikrein-Kinin-Systems im Plasma ist die Bindung des inaktiven Hageman-Faktors (Faktor XII) an negative Oberflächen nach Schädigung des Gefäßendothels mit daraus resultierender Freilegung der Basalmembran. Nach seiner Aktivierung vermittelt der aktive Faktor XII die Abspaltung des Plasmakallikreins von seiner Vorstufe dem Präkallikrein. Aus dem hochmolekularen Kininogen (HMKG) wird durch die Wirkung vom Präkallikrein Bradykinin freigesetzt (Bhoola et al. 1992).

Auf dem zweiten Aktivierungsweg des Kallikrein-Kinin-Systems wird das Gewebekallikrein aus dem Gewebeprekallikrein proteolytisch abgespalten. Die Wirkung dieses Produkts entfaltet sich durch die Bildung des aktiven Kinins Kallidin aus dem niedermolekularen Kininogen oder auch LMWK genannt (Bartho et al. 1991).

Kinine können auch ohne Aktivierung von Kallikrein gebildet werden. Dies geschieht über die Freisetzung von bestimmten Enzymen (andere Proteasen) von Mastzellen oder Granulozyten (Proud et al. 1985).

Viele Arbeiten belegen das Vorkommen der Kinine im Zentralnervensystem. Die nachgewiesenen aktiven Kallikreinformen im Hirngewebe lassen auf die Existenz von

Präkallikreinen und Aktivierungsproteasen schließen. Nachdem die Komponenten des Kallikrein-Kinin-Systems, wie Gewebekallikrein und Plasmakallikrein, im zentralen Nervensystem unterschiedlicher Säugetiere nachgewiesen wurde, wurde die Bedeutung der Bradykininwirkung bei diversen zerebralen Pathologien untersucht werden (Cerf et al. 2000, Chao et al. 1983, Kizuki et al. 1994, Mahabeer et al. 2000, Scicli et al. 1984). Zusammengefasst setzt sich das Kallikrein-Kinin-System aus den folgenden vier Komponenten zusammen:

1. Kininogene, als inaktive Vorstufen der Kinine
2. Kinin-freisetzende Enzyme, die Kininogenasen (z.B. Kallikrein),
3. Kinine, insbesondere Bradykinin und Kallidin, als eigentliche Effektoren
4. Kinin-inaktivierende Enzyme, die Kininasen (z.B. Carboxypeptidase B).

Bezüglich der Wirkdauer von Bradykinin lag die Bradykinin-Halbwertszeit bei Untersuchungen von Kariya et al. nach intraventrikulärer Injektion unter einer halben Minute. Dieses Ergebnis betont den zeitnahen Abbau von Bradykinin nach dessen Bildung (Kariya et al. 1982b). In Abbildung 2 wird die Aktivierungskette des Kallikrein-Kinin- Systems dargestellt.

Aktivierungskette des Kallikrein-Kinin-Systems

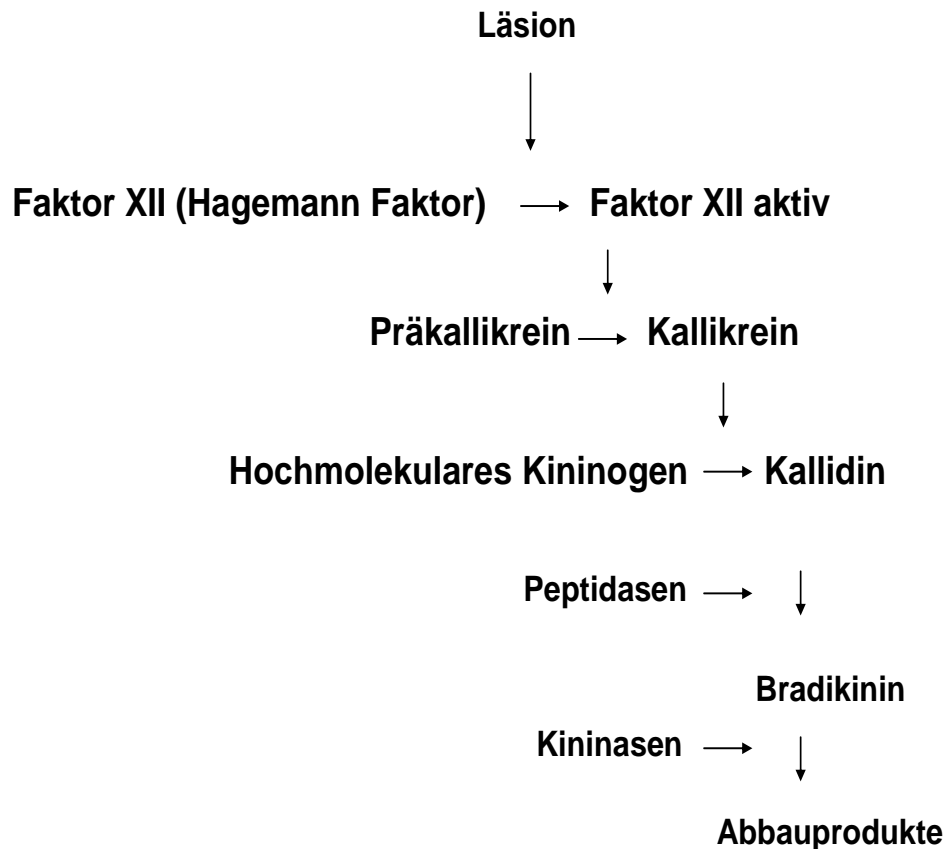


Abbildung 2:

Der Auslöser der Aktivierungskette des Kallikrein-Kinin-Systems im Plasma ist die Bindung des inaktiven Hageman-Faktors (Faktor XII) an negativen Oberflächen nach Schädigung des Gefäßendothels. Nach seiner Aktivierung vermittelt der aktive Faktor XII die Abspaltung des Plasmakallikrein von seiner Vorstufe, dem Präkallikrein. Aus dem hochmolekularen Kininogen (HMKG) entsteht das Kinin, aus dem durch die Wirkung von Aminopeptidasen Bradykinin entsteht. Das Bradykinin wird schließlich durch Kininasen abgebaut.

1.3.2 Kininrezeptoren

Regoli et al. postulierten 1980, dass die physiologische Wirkung der Kinine über zwei unterschiedliche G-Protein-gekoppelte Plasmamembranrezeptoren vermittelt wird, Diese werden Bradykinin B1-Rezeptor (B1R) und den Bradykinin B2-Rezeptor (B2R) genannt (Regoli et al. 1980). Bei weiteren Untersuchungen von Raidoo et al. ließen sich die Bradykininrezeptoren im Gehirn u.a. bei Neuronen des Hirnstamms und des Kortex nachweisen. Darüber hinaus konnte die Genexpression von B1R und B2R im Thalamus und Hypothalamus sowie in Astrozyten und Oligodendrozyten nachgewiesen werden (Raidoo et al. 1997). Ferner liessen sich die Arteriolen im Bereich der Pia mater durch Bradykinin dilatieren (Unterberg et al. 1984).

Pathophysiologisch spielen diese Rezeptoren für Hirnarterien eine wichtige Rolle. Kininrezeptoren von zerebralen Arterien wurden durch Untersuchungen identifiziert, welche sich mit der Wirkung von Agonisten und Antagonisten des B1R und des B2R auseinandersetzten (Whalley et al. 1983a, Whalley et al. 1987b). Zur funktionellen Differenzierung beider Rezeptorentypen wurde deren Genexpression näher untersucht. Der B2R ist konstitutiv in der Lunge, im Gefäßsystem, im Gastrointestinaltrakt und im Gehirn exprimiert (De Sousa et al. 2002, Raidoo et al. 1997, Raidoo et al. 1996, Hall et al. 1992).

Die meisten physiologischen Effekte von Bradykinin werden durch den B2R vermittelt. So reguliert dieser unter normalen Umständen die Vasodilatation von intra- und extrazerebralen Arterien sowie die Gefäßpermeabilität (Rosenblum W. I. 1986, Wahl et al. 1983b).

Der B1R ist unter physiologischen Bedingungen nicht oder nur in geringem Maße exprimiert, kann jedoch u.a. durch Ischämie, Trauma oder Entzündung induziert werden (Marceau et al. 1998, Austin et al. 1997, Pizard et al. 1998, Faussner et al. 1999). Im Rahmen einer Entzündungsreaktion induzieren bestimmte Zytokine, wie z.B. Interleukin-1 β (IL1 β), IL2, IL8, Transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) sowie Wachstumsfaktoren und Lipopolysaccharide (LPS) die Genexpression des B1R (Ni et al. 1998b).

Die Folge der Hochregulation ist eine verstärkte Kininwirkung mit daraus resultierender Freisetzung proinflammatorischer Zytokine wie IL-1 β oder TNF α (Tumor necrosis factor- α). Diese führen u.a. zu vermehrten chemotaktischen Aktivitäten der neutrophilen Granulozyten sowie zur Zunahme der Gefäßpermeabilität (Leeb-Lundberg et al. 2005, Hall et al. 1992, Blaukat et al. 2003, Sarker et al. 2000, Medeiros et al. 2004). Diese könnte die Bedeutung des B1R im Vergleich zu der B2R bei der Vermittlung von kinininduzierten Effekten nach Hirnverletzungen hervorheben.

Die Stimulation des B2R erfolgt vornehmlich durch Bradykinin und Kallidin, wohingegen die Peptide des-Arg9-Bradykinin und des-Arg9-Kallidin den B1R aktivieren. Die Entstehung der Kinine wird von Kininase I durch Abspaltung des C-terminalen Arginins von Bradykinin und Kallidin vermittelt (Mahabeer et al. 2000, Marceau et al. 1998, Raidoo et al. 1997, Regoli et al. 1980).

Die frühe Freisetzung des Bradykinins und die Induktion der Genexpression des B1R nach einer Gewebsschädigung sowie das starke entzündungs- und schmerzinduzierende Potential dieses Mediators wurden durch mehrere Arbeiten belegt. Die gewebsschutzenden Effekte durch Antagonisierung dieses Oligopeptids wurden bereits im Modell des Herz- und Niereninfarkts nachgewiesen. Der protektive Effekt war begleitet von einer reduzierten ischämieinduzierten Entzündungsreaktion (McClean et al. 2000, Souza et al. 2004, Lagneux et al. 2002, Yin et al. 2007). Quintàò konnte darüber hinaus eine bedeutende Rolle des B1R bei der Wahrnehmung von neuropathischen Schmerzen belegen (Quintàò et al. 2008).

Die Inhibition des B1R im Schlaganfall-Modell hatte ebenfalls einen neuroprotektiven Effekt. Dabei wurden nach einer transienten Okklusion der Arteria cerebri media (tMCAO-Modell) bei B1R-Knockout-Mäusen und B1R-Inhibitor-behandelten Wildtyp-Mäusen ein reduziertes Schlaganfallvolumen und eine kleinere Hirnödemausdehnung festgestellt. Die beiden Versuchsgruppen zeigten im weiteren Verlauf signifikant bessere neurologische Funktionen (Austin et al. 2009).

Nachdem im Schlaganfall-Modell ein eindeutiger neuroprotektiver Effekt der B1R-Blockade mit einer signifikanten Reduktion der sekundären Hirschädigung gezeigt werden konnte, wurde in der vorgelegten Arbeit am Modell der Kälteläsion bei der Maus den Effekt einer B1R induzierten Beeinflussbarkeit des posttraumatischen Hirnödems und der Traumaläsion durch B1R-Inhibition untersucht. Dafür wurde das Modell der Kälteläsion angewendet. In diesem Modell steht der Teilaspekt der Blut-Hirn-Schrankenstörung mit Ausprägung eines „vasogenen“ (extrazellulären) Hirnödems im Vordergrund (Vorbardt et al. 1985). Außerdem ist dadurch eine standardisierte, mess- und vergleichbare Läsion zu induzieren (Sirén et al. 2006).

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit war, die Rolle der B1R und B2R in der Entwicklung des posttraumatischen Hirnödems und des Sekundärschadens im Modell der Kälteläsion bei der Maus zu erforschen und die Eignung dieses Modells zur Beantwortung dieser Fragestellung zu untersuchen.

2 Material und Methoden

Die Untersuchungen wurden vom 2007 bis 2009 an der Neurochirurgischen Klinik der Julius-Maximilians-Universität Würzburg (Direktor: Prof. Dr. med. K. Roosen, seit 01.10.2009 Prof. Dr. R.-I. Ernestus) mit der Genehmigung der Regierung von Unterfranken (Tierversuchsvorhaben: 53/05 & 20/07) durchgeführt.

2.1 Versuchstiere

Die Versuchstiere stammten aus einer Zuchtlinie der Bradykinin B1R- und B2R Knockout (KO) der Tierhaltungseinrichtung der Neurologischen Universitätsklinik Würzburg, die aus dem genetischen Hintergrund eines C57/BL6 Mäusestammes abstammt. Schon in früheren Arbeiten wurden die Eigenschaften der mutanten Tiere untersucht. Die B1R-KO-, die B2R-KO- und B1R/B2R-KO-Mäuse zeigten in allen Untersuchungen bezüglich des Wachstumsverhaltens und/oder der Kreislaufparameter, wie Blutdruck und Puls, keinen relevanten Unterschied zu den C57BL/6 Wildtypen auch WT-Mäuse genannt (Pesquero et al. 2000, Cayla et al. 2007, Xu et al. 2005). Diese WT-Mäuse (Charles River Laboratory, Sulzfeld, Deutschland) dienten als Kontrollgruppe.

Zur Untersuchung der Wirkung des selektiven Kinin B1R-Antagonisten R-715 (Ac-Lys-[D- β NaI7, Ile8]desArg9-BK Biomatik corporation) in WT-Mäusen wurde das Präparat eine Stunde nach der Läsion i.v. in einer Dosis 0,5 mg/kg Körpergewicht und 1 mg/kg Körpergewicht verabreicht (Gobeil et al. 1996).

Für die selektive Blockade der Kinin B2R wurde das Hoe-140 (D-Arg0-Hyp3-Thi5-D-Tic7-Oci8-BK; 0,2 mg/kg Körpergewicht, Sigma Aldrich) ebenfalls eine Stunde nach der Läsion i.v. injiziert (Wirth et al. 1991). In den Kontrollgruppen erfolgte eine Injektion der jeweils entsprechenden Menge Placebo (physiologisches NaCl 0,9%).

Alle verwendeten Tiere waren 7-8 Wochen alt mit einem Gewicht zwischen 19-25 g. Für die Versuche wurden 186 männliche Tiere verwendet.

2.2 Versuchsablauf und Tiermodell

In den folgenden Tierexperimenten wurde die Arbeitshypothese getestet, dass die B1R für die Entwicklung des Hirnödems und der sekundären Hirnschaden nach Kälteläsion von maßgeblicher Bedeutung sind. Es wurden zeitliche und quantitative Darstellung der Genexpression der B1R und B2R im Hirngewebe nach Kälteläsion, Dokumentation der Läsionsgröße und des Ausmaßes des vasogenen Hirnödems nach Kälteläsion in B1R- und B2R-Knockout-Mäusen im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen durchgeführt.

Ferner erfolgte die Untersuchung des Einflusses von spezifischen pharmakologischen B1R- und B2R-Antagonisten auf die Läsionsgröße, das vasogene Hirnödem und die Genexpression von Entzündungsmarkern im Hirngewebe nach Kälteläsion.

2.2.1 Narkose

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

2.2.2 Fokale Kälteläsion

Bei diesem Experiment kommt es nach Aufsetzen der Kältesonde auf den Schädel zu einer Hirngewebsschädigung. Hierbei wird dem Hirngewebe durch die entstehung von Eiskristallen Wasser entzogen, dies verursacht eine Denaturierung der Zellmembran durch die erhöhte Salzkonzentration. Nach Entfernung der Kältesonde kommt es dann zu einer spontanen Erwärmung des geschädigten Gewebes, dabei entsteht eine Läsion von Nerven-, Glia- und Endothelzellen (Meryman et al. 1956). Im Randbereich dieser primären irreversiblen Hirnschädigung entwickelt sich eine Störung der Blut-Hirn-Schrankenfunktion.

Nach Fixierung des Kopfes des narkotisierten Versuchstiers in einer stereotaktischen Halterung (TSE Systems GmbH, Bad Homburg) wurde die Kopfhaut entlang der Medianlinie inzidiert und dann stumpf zur Seite präpariert. Die Läsionsstelle wurde 1,5 mm rechts lateral und 1,5 mm kaudal des Bregmas am rechten Os parietale markiert (**Abbildung 3**).

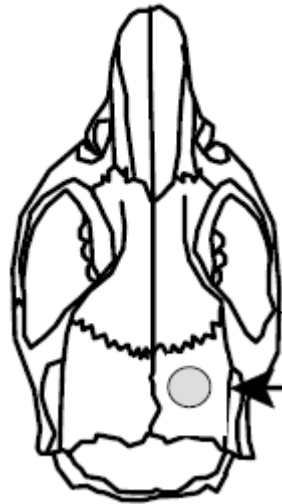


Abbildung 3:

Mausschädel in der Aufsicht: Läsionsstelle rechts parietal, 1,5 mm lateral und 1,5 mm kaudal des Bregmas.

Zunächst wurden mit Hilfe des stereotaktischen Gerätes (**Abbildung 5**) die Koordinaten der genauen Zielstelle des Mausschädels gemessen und lokalisiert. Zur Probe wurde die Kältesonde (**Abbildung 4**) ungekühlt aufgesetzt. Mit diesem Verfahren wurde die Position der Sonde zum Hervorrufen der Läsion in ihren Koordinaten festgelegt. Nach Entfernung von der Zielstelle wurde die Sonde durch Befüllen des Hohlzylinders mit flüssigem Stickstoff abgekühlt. Der flüssige Stickstoff hatte eine Temperatur von -196°C . Unmittelbar anschließend wurde die Sonde für einen definierten Zeitraum von 90 Sekunden auf die vorher festgelegte Läsionsstelle aufgesetzt. Im Anschluß wurde die Sonde sofort entfernt und die Haut mit einer Naht verschlossen.

Die Ausdehnung der Primärläsion ließ sich im verwendeten Modell durch zwei Parameter steuern, den Durchmesser der Spitze der Sonde (2,5 mm), die mit der Schädelkalotte in Berührung kommt, und die Kontaktdauer der Sonde mit der Schädelka-

lotte. Es wurde durch mehrere Vorversuche die geeignete Kontaktdauer ermittelt, dabei wurden die Läsionen nach einer Kontaktdauer von 60 Sekunden, 90 Sekunden und 120 Sekunden verglichen. Die Läsionen, die nach einer Kontaktdauer von 90 Sekunden hervorgerufen wurden, waren für die vorliegende Fragestellung am besten auswertbar. Bezüglich des Sondendurchmessers wurden Sonden mit einem Durchmesser von 1,5 mm und 2,5 mm getestet. Die Läsionen, die mit dem Sondendurchmesser von 2,5 mm hervorgerufen wurden, ließen sich besser vermessen und auswerten.

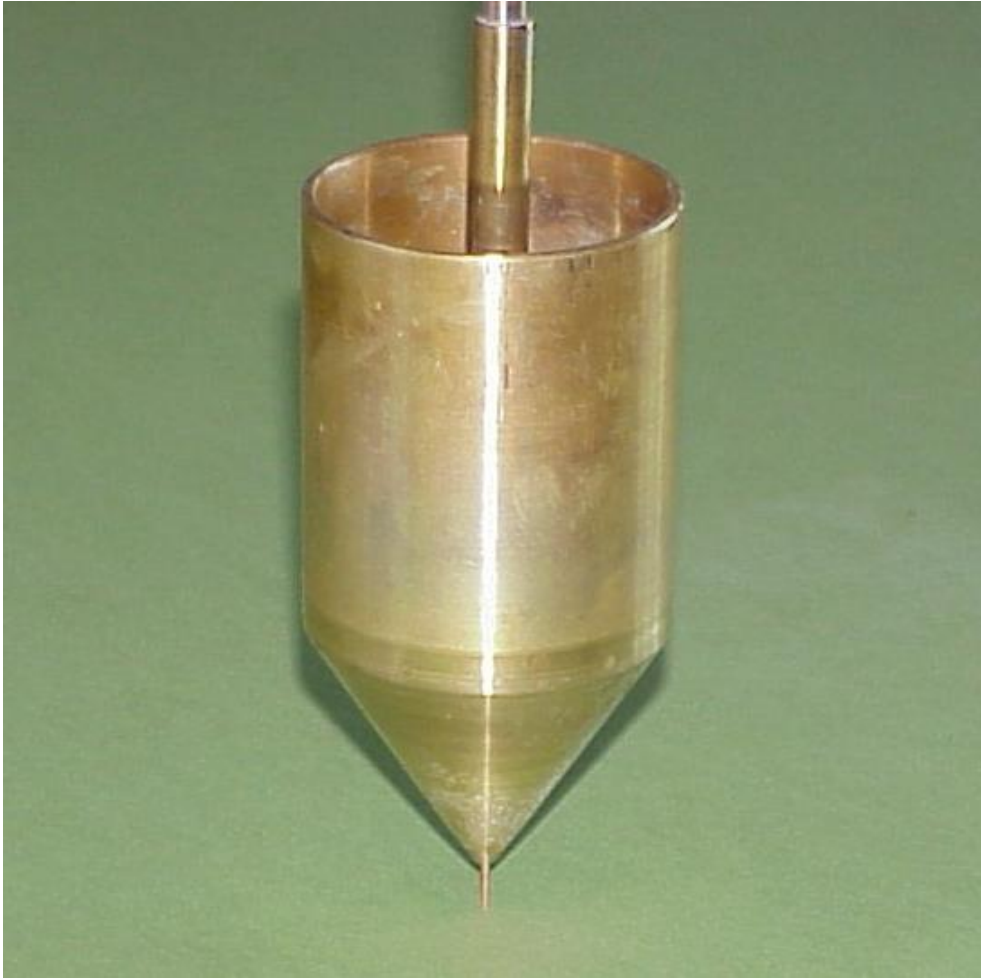


Abbildung 4:

Kältesonde zur Applikation der Kälteläsion. Sie bestand aus einem Kupferhohlzylinder, der konisch auf den eigentlichen Kontaktstempel zulief. Dieser Stempel mit einem Durchmesser von 2,5 mm wurde nach Befüllen des Zylinders mit flüssigem Stickstoff (-196°C) auf der Schädelkalotte rechts parietal aufgesetzt.

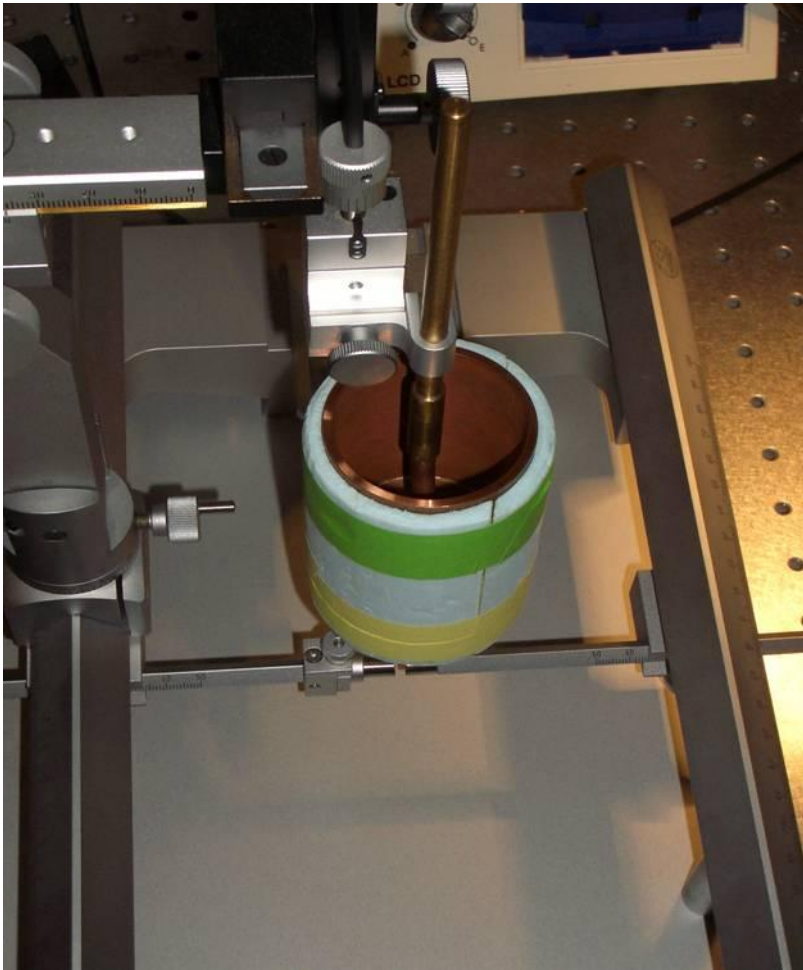


Abbildung 5:

Die in den Versuchen verwendete stereotaktische Halterung.

.2.3 Die posttraumatische Phase

Die Tiere wurden nach der Läsionsinduktion in Käfige verbracht, welche auf 37°C vorgewärmt waren. In diesen Käfigen blieben sie zwei Stunden bis zum Aufwachen. Danach wurden die Tiere bei Raumtemperatur mit freier Zugänglichkeit zu Nahrung und Wasser für die restliche posttraumatische Phase gehalten.

2.2.4 Entnahme des Gehirns

Zur Hirnentnahme wurden die Tiere erneut narkotisiert, die Anästhesie erfolgte mit 3,0 Vol % Isofluran (Forene®, Abbott GmbH & Co. KG, Wiesbaden) in 100 Vol. % Sauerstoff. Die tief narkotisierten Tiere wurden dann dekapitiert, die Hirne wurden zu weiteren Bearbeitung und Auswertung entnommen.

2.3 Bestimmung des Läsionsvolumens

Zunächst wurde das Nekrosevolumen 24 Stunden nach der Läsion als maximale Läsionsausdehnung dreidimensional bestimmt. Die Läsionsausdehnung wurde in Serienschnitten ermittelt, die in koronarer Schnittrichtung nach standardisierter Vorgehensweise mit einer zwei Millimeter Schichtdicke direkt nach Hirnentnahme angefertigt waren. Die Hirnscheiben wurden für 20 min bei Raumtemperatur mit 2% 2, 3, 5-Triphenyl-Tetrazolium-Chlorid (TTC) in PBS inkubiert, damit konnte die entstandene Nekrose von dem vitalen Hirngewebe differenziert werden. Anschließend wurden die Scheiben in 4% Paraformaldehyd (PFA) fixiert. Die Läsionsgröße wurde planimetrisch mit der Open Source Software "ImageJ" (National Institutes of Health, USA) vermessen. Unter Berücksichtigung der Schichtdicke der Hirnscheiben wurde daraufhin das Läsionsvolumen berechnet und in Kubikmillimeter angegeben (Swanson et al. 1990). Das Programm erlaubte eine weitere Vergrößerung der Hirnscheiben auf dem Monitor, dies ermöglichte eine präzise Quantifizierung der Läsionsareale.

Das Prinzip der TTC-Färbung basiert auf farblosen, wasserlöslichen Tetrazoliumsalzen, die als Elektronenfänger bei Reduktions-Oxidations-Reaktionen des Zitratzyklus fungieren (Klein et al. 1981). Unter Reduktionsbedingungen wandeln sie sich in gefärbte Stoffe um, sog. Formazane, die sich aufgrund ihrer Unlöslichkeit dort niederschlagen, wo sie entstehen. Die Enzymaktivitäten im lebenden Gewebe lassen TTC einen roten Farbstoff bilden, somit erfolgt eine Rot-Färbung dieser Gebiete. In den infarzierten Arealen findet kein Stoffwechsel mehr statt, so dass diese Bezirke ungefärbt bleiben (Jestädt et al. 1959, Kleinschnitz et al. 2006, Kleinschnitz et al. 2007). Eine HE-Färbung (Hämatoxylin-Eosin-Färbung) wurde bei weiteren Präparaten durchgeführt. Diese stellt die Routine-Färbung der Wahl dar. Dabei lassen sich Zellkerne blau-violett und Zytoplasma rosa färben. Das nekrotische Läsionsareal erscheint dann hell und vom dunklen vitalen Gewebe gut unterscheidbar.

2.4 Bestimmung des vasogenen Hirnödems

Zur Evaluation der Integrität bzw. zur Bestimmung des Störungsausmaßes der Bluthirnschranke 24 Stunden nach der Läsion wurde den Mäusen i.v. der wasserlösliche, mit hoher Affinität an Albumin bindende Farbstoff 2% Evans Blau (EB, Sigma Aldrich; n=6/Gruppe) injiziert. EB bindet sich quantitativ an das Serumalbumin, dadurch entsteht ein Farbstoff-Protein-Komplex, welcher unter normalen Bedingungen der Gefäßpermeabilität der Bluthirnschranke nicht von intravasal in das Hirngewebe austritt. Bei Störungen der Bluthirnschranke und der Gefäßpermeabilität, wie z.B. unter Traumabedingungen, kommt es zum Austreten dieser Farbstoff-Protein-Komplexe in das Hirngewebe. Das Ausmaß der Komplex-Anhäufung im Hirngewebe, d. h. die Farbintensität und Ausdehnung, entspricht dem Störungsausmaß der Bluthirnschranke (Wolman et al. 1981).

Die i.v. Injektion von 0,1 ml des Farbstoffes wurde zwei Stunden nach der Läsionsinduktion, d. h. eine Stunde nach der Behandlung mit B1R-, B2R-Antagonisten oder NaCl 0,9 %, durchgeführt. Diese wurde 30 Minuten vor der Dekapitation der Tiere wiederholt. Die Läsionsstelle, welche eine Störung der Blut-Hirn-Schranke aufweist, wird dann blau gefärbt. Je intensiver die EB-Extravasation bzw. je größer der blau gefärbte Teil des Gehirns, desto stärker ist die Störung der Blut-Hirn-Schranke (Wolman et al. 1981).

Die EB-Extravasation (der blau gefärbte Hirnanteil) wurde planimetrisch mit der Open Source Software "ImageJ" (National Institutes of Health, USA) vermessen. Das Programm erlaubte eine weitere Vergrößerung der Hirnscheiben auf dem Monitor, dies ermöglichte eine präzise Quantifizierung der EB-Extravasation. Unter Berücksichtigung der Schichtdicke der Hirnscheiben wurde daraufhin das Volumen des blau gefärbten Hirnanteils in Kubikmillimeter bestimmt (Swanson et al. 1990).

2.5 Expressionsanalyse von Entzündungsmediatoren und Bradykininrezeptoren auf mRNA-Ebene mittels Real Time Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR)

Nach Bindung der Kinine an den Bradykininrezeptoren kommt es zur Freisetzung von Mediatoren, wie Prostaglandin, Stickstoffmonoxid (NO) und Ca^{2+} , diese vermitteln dann die eigentliche Wirkung der Kinine (Vanhoutte et al. 1989, Bhoola et al. 1992, Kintsurashvili et al. 2001). Zum besseren Verständnis der Regulation und der Rolle der zwei Rezeptoren des KKS wurde auch auf die RT-PCR-Analyse der beiden Rezeptoren zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Trauma eingegangen. Dies erfolgte zur weiteren Untersuchung der Reaktionen auf zellulärer Ebene, außerdem sollten dadurch bekannte Aspekte durch neue Daten komplettiert werden.

Dafür erfolgte die Quantifizierung der mRNA-Expression der B1R, B2R sowie bestimmter entzündungsspezifischer Zytokine wie das IL-1 β , TGF β -1, IFN γ und TNF α . TNF α ist ein Zytokin, welches eine Entzündung im Körper verstärkt (Hehlhans et al. 2005, Mautes et al. 1996b, Rink et al. 1995, Ehrenfeld et al. 2006, Rahman et al. 2006) und zu einer Erhöhung der Blut-Hirn-Schranken-Permeabilität führt (Kossmann et al. 1996a, McClain et al. 1991). Die Interferone sind Zytokine, die bestimmte Proteinbildung in den Zellen induzieren. Diese Proteine können die Zellen gegen virale Infektionen widerstandsfähiger machen (Isaacs et al. 1957, Ott et al. 1994, Holmin et al. 1995, Mautes et al. 1996a, Fabry et al. 1994). Das TGF β 1 beeinflusst das Nervensystem über unterschiedliche Mechanismen mit vielfältigen Wirkungen, dabei ist die Wirkung des TGF β 1 von der jeweiligen molekularen Umgebung abhängig (Krieglstein et al. 1994, Krieglstein et al. 1995a, Krieglstein et al. 1995b, Krieglstein et al. 1996, Krieglstein et al. 1998b).

Die TaqMan Technologie von Applied Biosystems (Deutschland) wurde für diesen Zweck genutzt. Die spezifischen PCR-Primer und Sonden gegen die Zielgene wurden als TaqMan Gene Expression Arrays (Applied Biosystems) bezogen. Die RT-PCR wurde mit dem TaqMan Universal PCR Mastermix in einem Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) durchgeführt. Aus dem Bereich der Läsion bzw. der Scheinläsion (Koordinaten: 1,5 mm posterior, 1,5 mm lateral der Bregma) posterior wurde 4, 12, 24 und 48 Stunden nach der Läsionsinduktion

Gewebe gewonnen. Das Gewebe wurde mit Micra (D-8 power homogenizer (ART, Deutschland) zerkleinert und die RNA mit Trizol isoliert (Trizol reagent, Invitrogen, Deutschland). Mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase kann aus RNA die dazu komplementäre cDNA hergestellt werden. Dementsprechend wurden 250 µg der RNA mit TaqMan Reverse Transcription Reagents (Applied Biosystems) nach dem Herstellerprotokoll inkubiert. Die RT-PCR wurde mit gleichen Mengen von cDNA im GeneAmp 7700 sequence detection system (Applied Biosystems) mit dem TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems) durchgeführt.

Alle RT-PCR-Ansätze wurden nach festgelegtem Temperaturregime mit jeweils 3 µl Template cDNA (aus jeweils 1,5 µg Gesamt-RNA) durchgeführt: 50 °C für 2 Minuten und bei 95 °C für 10 Minuten inkubiert, darauf folgten 40 Zyklen für jeweils 15 Sekunden bei 95 °C und 1 Minute bei 60 °C. RT-PCR-Primer und Proben wurden mausspezifisch für B1R (assay ID: Mm00432059_s1), B2R (assay ID: Mm00437788_s1), IL-1 β (assay ID: Mm004344228_m1), TGF β -1 (assay ID: Mm00441724_m1), Endothelin-1 (ET-1) (assay ID: Mm 00438656_m1), Interferon γ (IFN γ) (assay ID: Mm99999071_m1), und Tumor necrosis factor (TNF) (assay ID: Mm00443258_m1) von TaqMan Gene Expression Arrays (Applied Biosystems) eingesetzt. Als endogene Kontrolle "Housekeeping" wurde 18s rRNA (TaqMan Predeveloped Assay Reagents for gene expression, part number: 4319413E; Applied Biosystems) verwendet. Kontrollproben aus Wasser wurden zur Sicherstellung der Spezifität der RT-PCR-Untersuchung gegenüber der RNA-Probe benutzt. Jede Probe wurde auf ihre Integrität durch die Analyse der Amplifikationsdarstellung kontrolliert. Die relative Quantifizierung der Genexpression folgte mittels der $\Delta\Delta C_t$ Methode (Livak and Schmittgen, 2001; Austinat et al., 2009).

2.6 Histologie und Immunhistochemie

Die fixierten Präparate wurden ausgehend vom Okzipitalpol bis zum Frontalpol in 4µm-Schichten koronarer Schnittrichtung nach einem standardisierten Verfahren angefertigt. Nach der Entparaffinisierung der Hirnschnitte wurden diese für die Makrophagenfärbung mit einer Proteaselösung in Aqua dest. für 30 min vorbehandelt oder für die T-Zell- und Neutrophilenfärbung für 30 min in 1 mM EDTA gekocht. Nach der Vorbehandlung erfolgte das Blocken mit 10% BSA für 30 min. Die Inkubation der

Schnitte mit dem primären Antikörper erfolgte bei 4 °C über Nacht. Dabei wurden Makrophagen mit einem gegen F4/80 gerichteten Antikörper (1:100 in 1%BSA/PBS; Ratte; Acris), T-Zellen mit einem anti-CD3-Antikörper (1:200 in 1%BSA/PBS, Kaninchen; Abcam) und Neutrophile mit einem anti-Neutrophile-Antikörper (1:100 in 1%BSA/PBS, Ratte; Serotec) detektiert. Es folgte der POD-Blockschritt für 15 min mit 0,5% H₂O₂ in Methanol. Die Inkubation mit den entsprechenden sekundären Antikörpern (anti-Ratte bzw. anti-Kaninchen, je 1:100 in 1%BSA/PBS) fand für 45 min bei Raumtemperatur statt. Nach jedem Inkubationsschritt wurde dreimal für je 5 min mit PBS gewaschen. Die Schnitte wurden daraufhin mit dem AB-Komplex (1:100 in TBS; Dako) für 30 min bei Raumtemperatur behandelt und anschließend mit DAB für 10 min entwickelt.

2.7 Statistik

Für die unverbundenen Stichproben wurde eine Varianzanalyse der Ergebnisse durchgeführt. Die Nullhypothese wurde mit einer Wahrscheinlichkeit unter 5% verworfen. So lag in den Versuchen eine statistische Signifikanz vor, wenn der p-Wert $\leq 0,05$ war. Bei einer Abweichung von der Normalität bei der Verteilung der Stichproben wurde der Vergleich von verschiedenen unabhängigen Stichproben nach dem Kruskal-Wallis-Test durchgeführt (Theodorsson 1986). Anschließend erfolgte die Anwendung des U-Tests nach Mann-Whitney (Prism Graph 4.0, GraphPad Software, software package Mann-Whitney test) (Mann 1947). Für die Korrelation wurde der Test nach D`Agostino verwendet (D`Agostino 1986, Pearson and Stephens 1964). Die statistischen Ergebnisse wurden im Text und in den Abbildungen in Form von Mittelwert \pm Standardabweichung des arithmetischen Mittels der Stichproben angegeben.

2.8 Versuchsgruppen

Insgesamt wurden 186 Tiere operiert. Die intraoperativ oder postoperativ verstorbenen Tiere und die Tiere mit einer sichtbaren Missbildung wurden in der Auswertung nicht berücksichtigt. 19 Tiere sind intraoperativ oder postoperativ verstorben, bei 4 Tieren kam es zu intracerebralen Blutungen, bei einem Tier fehlte das rechte Auge. Insgesamt mussten 24 Tiere aus der Auswertung ausgeschlossen werden. Die Versuche wurden dann in 6 Etappen durchgeführt.

2.8.1 TTC-Färbung I

Für den ersten Versuchsteil wurden die Tiere drei Gruppen (jeweils n=7) zugeordnet.

Gruppe 1: Wildtyp-Mäuse

Gruppe 2: B1R-Knock out Mäuse

Gruppe 3: B2R-Knock out Mäuse

2.8.2 TTC-Färbung II

Für diesen Versuchsteil wurden die Tiere zwei Gruppen (jeweils n=7) zugeordnet:

Gruppe 1: Wildtyp-Mäuse mit 0,9%NaCl-Behandlung eine Stunde vor der Läsion.

Gruppe 2: Wildtyp-Mäuse mit B1R-Blockade (1mg/kg Körpergewicht R-715) eine Stunde vor der Läsion.

2.8.3 TTC-Färbung III

Für diesen Versuchsteil wurden die Tiere in vier Gruppen (jeweils n=7) unterteilt

Gruppe 1: Wildtyp-Mäuse mit 0,9%NaCl-Behandlung eine Stunde nach der Läsion.

Gruppe 2: Wildtyp-Mäuse mit B1R-Blockade (1mg/kg Körpergewicht R-715) eine Stunde nach der Läsion.

Gruppe 3: Wildtyp-Mäuse mit B1R-Blockade (0,5mg/kg Körpergewicht R-715) eine Stunde nach der Läsion.

Gruppe 4: Wildtyp-Mäuse mit B2R-Blockade (0,2mg/kg Körpergewicht Hoe-140) eine Stunde nach der Läsion.

Gruppe 5: Wildtyp-Mäuse mit B2R-Blockade (0,4mg/kg Körpergewicht Hoe-140) eine Stunde nach der Läsion.

2.8.4 Evans Blau-Färbung

Für diesen Versuchsteil wurden die Tiere drei Gruppen (jeweils n=6) zugeordnet:

Gruppe 1: Wildtyp-Mäuse mit 0,9%NaCl-Behandlung eine Stunde nach der Läsion.

Gruppe 2: Wildtyp-Mäuse mit B1R-Rezeptorenblockade (1mg/kg Körpergewicht R-715) eine Stunde nach der Läsion.

Gruppe 3: Wildtyp-Mäuse mit B2R-Rezeptorenblockade (0,2 mg/kg Körpergewicht Hoe-140) eine Stunde nach der Läsion.

Die i.v. Injektion von 0,1 ml des Farbstoffes wurde zwei Stunden nach der Läsionsinduktion, d. h. eine Stunde nach der Behandlung mit B1R-, B2R-Antagonist oder 0,9%NaCl durchgeführt. Diese wurde 30 Minuten vor der Dekapitation der Tiere wiederholt.

2.8.5 Teil der RT-PCR-Analyse

Für diesen Versuchsteil wurden die Tiere drei Gruppen (jeweils n=5) zugeordnet:

Gruppe 1: Wildtyp-Mäuse mit 0,9%NaCl-Behandlung eine Stunde nach der Läsion.

Gruppe 2: Wildtyp-Mäuse mit B1R-Rezeptorenblockade (1mg/kg Körpergewicht R-715) 1Stunde nach der Läsion.

Gruppe 3: Wildtyp-Mäuse mit B2R-Rezeptorenblockade (0,2mg/kg Körpergewicht Hoe-140) 1Stunde nach der Läsion.

Gruppe 4: Wildtyp-Mäuse mit einer Scheinläsion

Bei den vier Gruppen wurde eine Quantifizierung der mRNA-Expression der B1R, B2R sowie der Zytokine IL-1 β , TGF β -1, IFN γ und TNF α durchgeführt.

2.8.6 Teil der Immunhistochemie

Für den fünften Versuchsteil wurden die Tiere drei Gruppen (jeweils n=5) zugeordnet:

Gruppe 1: Wildtyp-Mäuse

Gruppe 2: B1R-Knock out Mäuse

Gruppe 3: B2R-Knock out Mäuse

2.9 Ausschlusskriterien

Wenn die Tiere bestimmte Versuchs-kriterien nicht erfüllt hatten, wurden diese von der Auswertung ausgeschlossen,

2.9.1 Präparation

Eine Verletzung der Schädelkalotte ebenso wie eine Blutung führte zum Ausschluss der betroffenen Tiere von der Auswertung.

2.9.2 Kälteläsion

Wenn die Vereisungszone auf der Schädelkalotte nicht deutlich und gleichmäßig gelang, sowie bei Abweichungen vom festgelegten Protokoll bei der Induktion der Kälteläsion wurden die Tiere von der Auswertung ausgeschlossen.

2.9.3 Krankheiten, Anomalien

Die Versuchstiere sollten keine sichtbaren Anomalien oder Erkrankungen nachweisen.

3 Ergebnisse

3.1 Lokaler Befund beim Versuchstier

Nach der Induktion der Kälteläsion für 90 Sekunden entstand eine kreisförmige Vereisungszone, die sich von der intakten Schädelkalotte gut unterscheiden ließ. Das rundliche Läsionsareal entsprach dem zylinderförmigen Stempel der Kältesonde.

Hinweise für eine Infektion des Operationsbereiches wurden zum Zeitpunkt der Hirnentnahme bei keinem Versuchstier festgestellt.

3.2 Posttraumatische relative Genexpression der B1R und B2R zu unterschiedlichen Zeiten

Wir haben die mRNA-Genexpression der B1R und B2R zu unterschiedlichen Zeitpunkten (4 Stunden, 12 Stunden und 24 Stunden) nach dem Trauma untersucht. Die gemessenen Werte wurden mit den Werten der mRNA-Genexpression der beiden Rezeptoren bei den scheinläderten Tieren zu den entsprechenden Zeiten verglichen. Die mRNA-Genexpression beider Rezeptoren (B1R und B2R) wies bei den scheinläderten Tieren ein niedriges Niveau auf, hierbei lag die B1R-mRNA bei $2 \pm 0,5$ ($n=5$) und die B2R-mRNA bei $2 \pm 0,25$ ($n=5$). Während bei läderten Tieren 4 Stunden nach Trauma die B1R-mRNA bei 12 ± 10 ($n=5$) und die B2R-mRNA bei 7 ± 4 ($n=5$) dokumentiert wurden, änderte sich die Relation beider mRNA-Genexpressionen 12 Stunden nach Trauma zu Gunsten der B2R-RNA, die B1R-mRNA lag bei 3 ± 2 ($n=5$) und die B2R-mRNA bei 7 ± 2 ($n=5$). Bei einer erneuten Messung 24 Stunden nach Trauma setzte sich die Dominanz der B2R-mRNA mit 7 ± 2 ($n=5$) im Vergleich zur B1R-mRNA von 4 ± 3 ($n=5$) fort. Die Werte der B1R- und B2R-Genexpression sind in der **Abbildung 6** dargestellt.

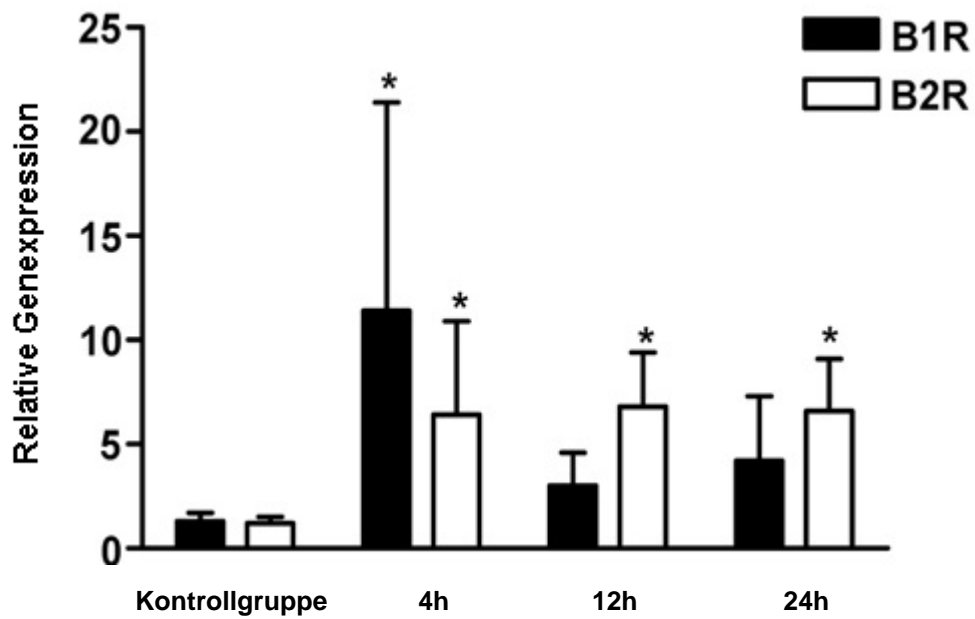


Abbildung 6:

Hochregulation der B1R und B2R nach Trauma mit einer Dominanz der B1R-Genexpression in den ersten 4 Stunden, während die B2R die späteren Phasen dominierten, * $p \leq 0.05$.

3.3 Läsionsvolumen in den B1R- und B2R-KO-Tieren

Im ersten Versuchsteil wurde bei B1R- und B2R-Knockout-Mäusen sowie Wildtyp-Mäusen nach dem oben geschilderten Verfahren eine Läsion induziert. 24 Stunden nach der Läsion wurden die Tiere dekapitiert, die Hirne entnommen und nach dem beschriebenen Standardverfahren geschnitten. In der HE-Färbung wiesen die Läsionen im Cortex-Bereich ein größeres Ausmaß in der Tiefe und in der Breite bei den Wildtyp-Mäusen im Vergleich zu den B1R-Knockout-Mäusen auf (**Abbildung 7**). Zur genaueren Evaluation wurde die TTC-Färbung eingesetzt. Mittels TTC-Färbung ließ sich das vitale Gewebe rot anfärben, das Läsionsgewebe blieb hingegen ungefärbt. Das Läsionsvolumen wurde daraufhin planimetrisch vermessen. Die Läsionen waren in den Hirnen der B1R-KO-Mäuse im Vergleich zu den Läsionen der Wildtyp-Mäuse signifikant kleiner ($2,5 \pm 2,6 \text{ mm}^3$ (n=7) vs. $11,5 \pm 3,9 \text{ mm}^3$ (n=7); $p=0.0008$). Das Läsionsvolumen in den B2R-KO Mäusen 24 Stunden nach der Läsion war mit dem der Wildtyp-Mäuse vergleichbar (**Abbildung 8**).

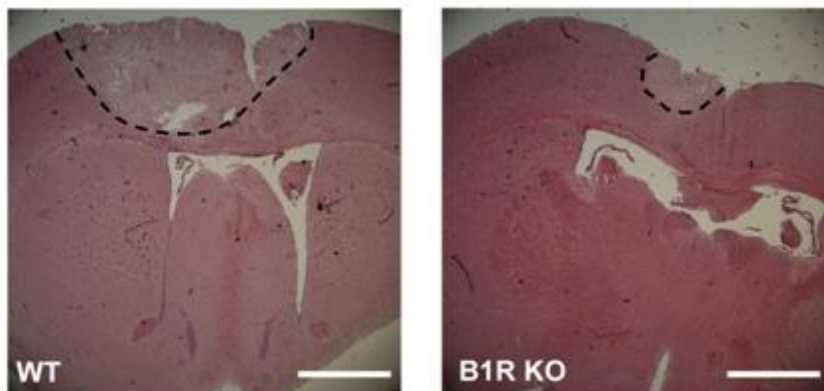


Abbildung 7:

In der Hämatoxylin-Eosin-Färbung zeigten sich die Läsionen im Cortex-Bereich bei den Wildtyp-Mäusen deutlich breiter und tiefer als bei den B1R-Knockout-Mäusen.

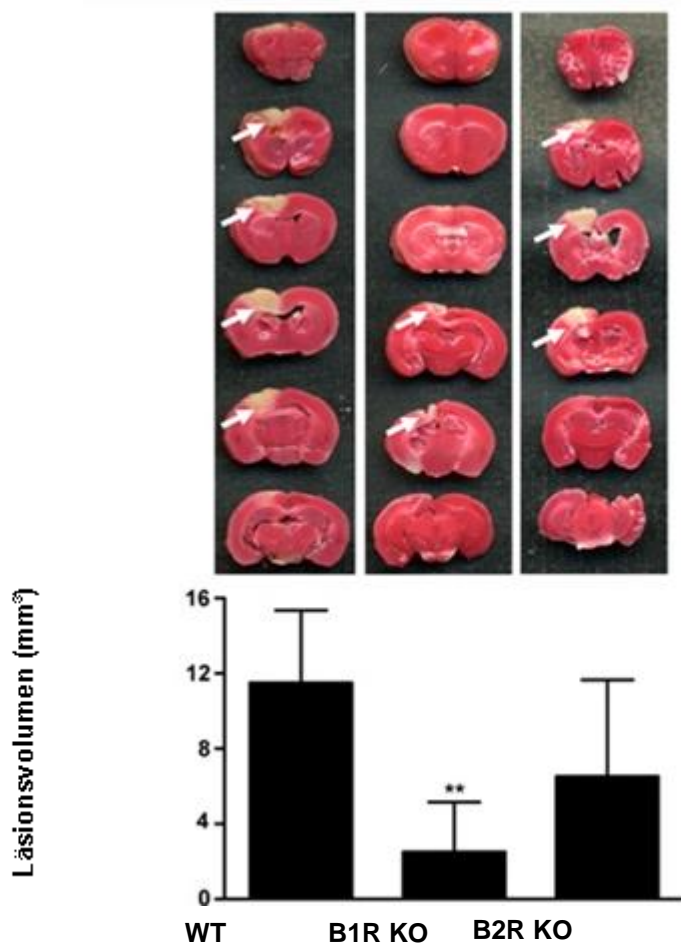


Abbildung 8:

B1R-KO-Mäuse entwickelten signifikant kleinere Läsionen im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen. Das Läsionsausmaß in den B2R-KO Mäusen 24 Stunden nach der Läsion war mit dem der Wildtyp-Mäuse vergleichbar. ** $p \leq 0,005$, $n=7$ /Gruppe.

3.4 Läsionsvolumen nach Vor- und Nachbehandlung mit Bradykinin-Rezeptor-Antagonisten

3.4.1 Behandlung mit B1R-Antagonisten (R-715)

Zur Überprüfung des neuroprotektiven Effektes bei Hemmung der Bradykininwirkung auf die B1R wurde die Wirkung des B1R-Antagonisten R-715 auf das Nekrosevolumen 24 Stunden nach der Läsion untersucht. Hierfür wurde bei 7 Wildtyp-Mäusen der B1R-Antagonist (R-715) in der Dosierung von 1 mg/kg Körpergewicht eine Stunde vor der Läsionsinduktion intravenös verabreicht. Diese Dosierung wirkte schon im Schlaganfall-Modell neuroprotektiv (Austin et al. 2009). Weitere sieben Wildtyp-Mäuse bekamen stattdessen eine 0,9% NaCl-Injektion. In diesem Experiment zeigten sich die Läsionsvolumina der B1R-blockierten Wildtyp-Mäuse mit denen der B1R-KO-Mäuse vergleichbar.

Nachdem die Experimente eine grundsätzliche therapeutische Wirksamkeit der Vorbehandlung mit dem B1R-Antagonisten (R-715) auf das Läsionsvolumen nach Trauma gezeigt haben (proof of principle), sollten weitere Versuche dessen Wirksamkeit unter klinisch relevanten Bedingungen nach einem Trauma prüfen. Hierfür wurden die Rezeptorantagonisten 60 Minuten nach Läsionsinduktion verabreicht. Des Weiteren sollten zur Beurteilung der Korrelation zwischen Wirkung und Dosierung der B1R-Blockade eine Stunde nach der Läsionsinduktion zwei verschiedene Dosierungen des Inhibitors intravenös verabreicht werden (Gobeil et al. 1996). Während die Dosis von 0,5 mg/kg Körpergewicht keine signifikante Änderung des Läsionsvolumens im Vergleich zu der Placebo-Behandlung bewirkte ($9,6 \pm 5,2 \text{ mm}^3$ versus $11,7 \pm 4,8 \text{ mm}^3$, $p = 0,065$), zeigte sich die Dosis 1 mg/kg Körpergewicht eindeutig neuroprotektiv. Die mit B1R-Antagonisten (R-715) behandelten Tiere entwickelten signifikant kleinere Hirnläsionen im Vergleich zu den Tieren, die mit Placebo behandelt wurden ($2,6 \pm 1,4 \text{ mm}^3$, $n=7$ vs. $11,7 \pm 4,8 \text{ mm}^3$, $n=7$; $p=0,0034$) (**Abbildung 9**).

3.4.2 Behandlung mit B2R-Antagonisten (Hoe-140)

Die selektive B2R-Blockade zeigte in unserem Versuch keine signifikante Beeinflussung des Ausmaßes der Kälteläsion im Maus-Modell mit einer Dosis von 0,2 mg/Kg und 0,4 mg/Kg Körpergewicht (Wirth et al. 1991). Die Läsionsvolumina bei diesen Tieren waren zwar kleiner im Vergleich zu den Tieren der Placebo-Gruppe, aber der Unterschied der Läsionsvolumina war statistisch nicht signifikant $8,4 \pm 2,77 \text{ mm}^3$ (n=7) vs. $11,7 \pm 4,8 \text{ mm}^3$ (n=7), $p=0,0667$.

Die kälteinduzierte Hirnläsion war nach einer einmaligen intravenösen Gabe des B1R-Antagonisten (R-715) mit der Dosis 1 mg/kg Körpergewicht signifikant kleiner als bei den Tieren der Kontrollgruppen. Demgegenüber konnte nach der einmaligen intravenösen Gabe von Hoe-140 in der wirksamen Dosierung von 0,2 mg/Kg Körpergewicht kein signifikanter Unterschied des Läsionsvolumens im Vergleich zu den Tieren der Kontrollgruppe festgestellt werden (**Abbildung 9**).

Vor Läsionsinduktion Nach Läsionsinduktion

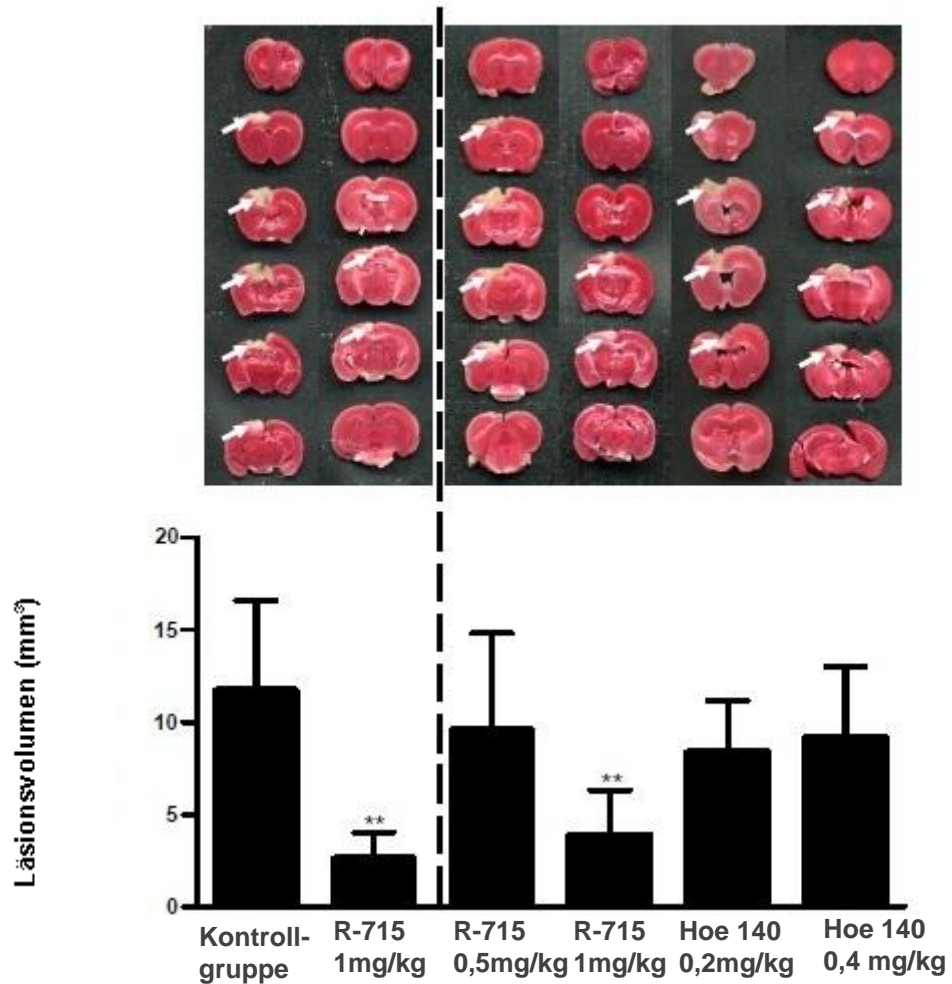


Abbildung 9:

B1R-Blockade vermindert den Hirnschaden nach Trauma. Die Vorbehandlung eine Stunde vor der Läsion sowie die Nachbehandlung eine Stunde nach der Läsion mit dem B1R-Antagonisten R-715 (1 mg/kg Körpergewicht) reduzierten signifikant das Nekrosevolumen im Vergleich zu der Placebo-Behandlung. Nach der Gabe vom B2R-Antagonisten Hoe-140 (0,2 oder 0,4 mg/kg Körpergewicht) war das Läsionsvolumen kleiner als in der Kontrollgruppe, aber ohne statistische Signifikanz. ** $p \leq 0,05$, $n=7$ /Gruppe.

3.5 Bestimmung des vasogenen Hirnödems nach dem Trauma

Weitere Versuche sollten die Wirkmechanismen des B1R-Antagonisten R-715 auf die Entwicklung des vasogenen Hirnödems untersuchen. Da das vasogene Hirnödem auf eine Störung der Blut-Hirn-Schranke zurückzuführen ist (Mendelow & Teasdale 1983), wurde den Mäusen zur Bestimmung des Störungsausmaßes nach der Läsion i. v. der wasserlösliche, mit hoher Affinität an Albumin bindende Farbstoff EB (n=6/Gruppe) injiziert.

18 Tiere wurden operiert. Bei jeweils sechs Tieren wurden eine Stunde nach der Läsionsinduktion B1R-Antagonist R-715 1 mg/kg Körpergewicht, B2R-Antagonist Hoe-140 0,2 mg/kg Körpergewicht oder 0,2 ml NaCl 0,9% i. v. verabreicht. Eine Stunde später wurden 0,1 ml einer 2% EB-Lösung intravenös injiziert. Die EB-Injektion wurde 30 Minuten vor der Dekapitation der Tiere wiederholt. Das Ausmaß der Störung der Blut-Hirn-Schranke bzw. das Ausmaß des vasogenen Hirnödems entsprach dann dem Ausmaß der EB-Extravasation oder des planimetrisch gemessenen Volumens des blaugefärbten Hirnanteils im lädierten Hirn (Wolman et al. 1981).

Die Ergebnisse zeigten eine eindeutige Tendenz. Bei Wildtyp-Mäusen, die eine Behandlung mit R-715 eine Stunde nach der Läsion erfahren haben, konnte im Vergleich zur Kontrollgruppe eine signifikant geringere EB-Extravasation festgestellt werden ($5,8 \pm 4,5 \text{ mm}^3$ versus $12,5 \pm 1 \text{ mm}^3$, n = 6/Gruppe, p < 0,05). Gleichzeitig führte die Nachbehandlung mit Hoe-140 oder mit NaCl 0,9 % zu einer vergleichbaren EB-Extravasation (**Abbildung 10**).

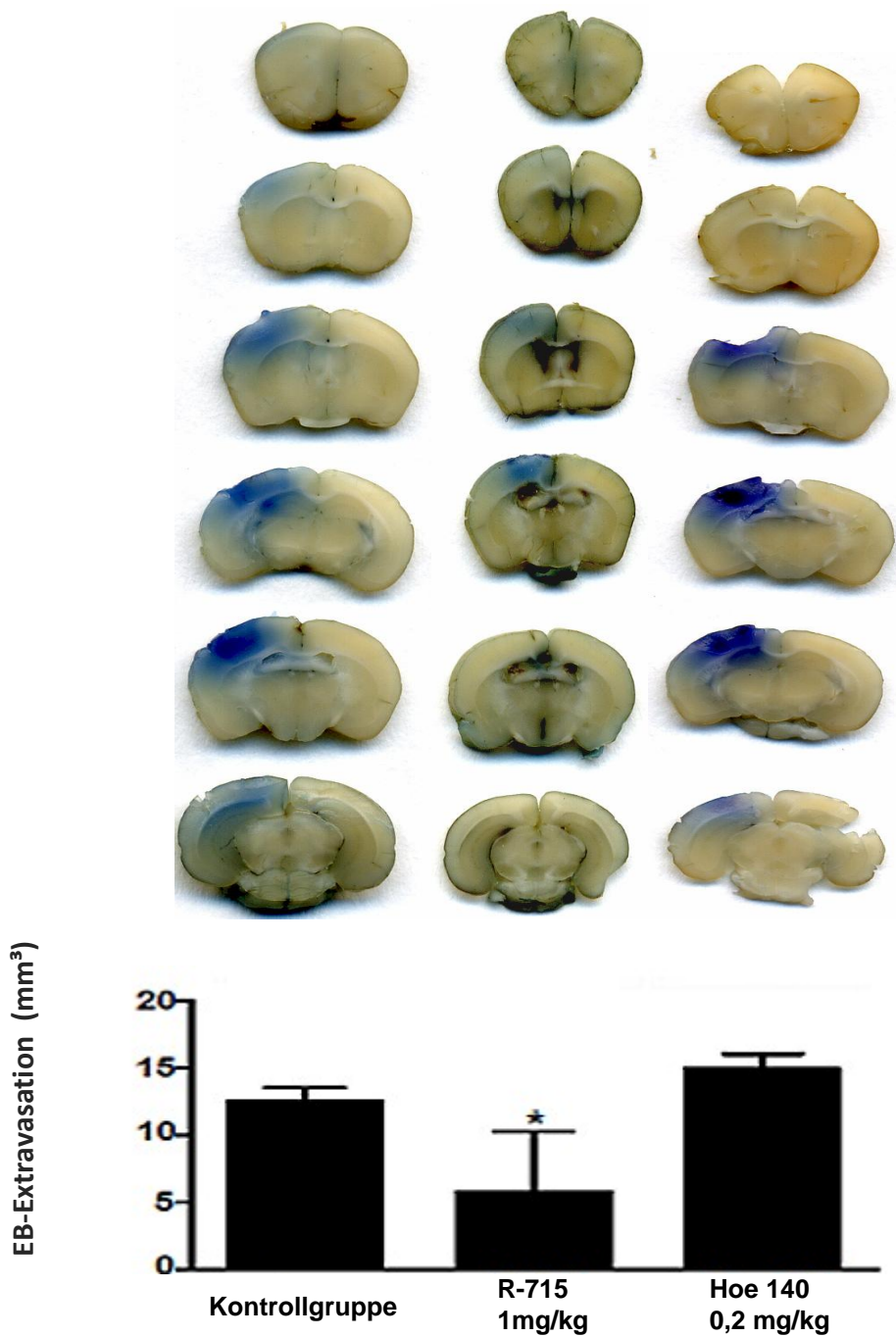


Abbildung 10:

Das Ausmaß der Blut-Hirn-Schrankenstörung mittels EB-Extravasation 24 Stunden nach der Läsionsinduktion nach der Gabe des B1R-Antagonisten R-715 (1 mg/kg Körpergewicht) signifikant geringer im Vergleich zu den Placebo-behandelten Tieren. Der B2R-Antagonist Hoe140 (0,2 mg/kg Körpergewicht) zeigte keine signifikante Wirkung auf die EB-Extravasation. *: $p \leq 0,05$, $n=6$ /Gruppe.

3.6 Genexpressionsanalysen mittels quantitativer RT-PCR

Nach Feststellung der Wirkung des B1R-Antagonisten auf die Entwicklung des Läsionsvolumens und des Hirnödems nach der Kälteläsion wurde sein Effekt auf die Genexpression bestimmter vasogener und proinflammatorischer Zytokine wie Endothelin-1 (ET-1), Interleukin-1 β (IL-1 β), Tumornekrosefaktor- α (TNF- α), Interferon γ (IFN γ) und Transforming Growth Faktor- β 1 (TGF- β 1) ermittelt.

3.6.1 Genexpression des Endothelin 1 (ET-1)

ET-1 spielt eine wichtige Rolle bei der Entstehung und Entwicklung des Hirnödems (Iglarz et al. 2007, Kirkby et al. 2008). Deshalb wurde in unseren Versuchen parallel zu den anderen Untersuchungen die Genexpression von ET-1 mittels der RT-PCR-Analyse untersucht. Dabei zeigte die ET-1-Genexpression nach einer Placebo-Injektion in der Kontrollgruppe sowie nach einer Behandlung mit dem B2R-Antagonisten Hoe-140 posttraumatisch eine vergleichbare Hochregulation ($3,1 \pm 0,42$ vs. $3 \pm 1,6$, $n=5$ /Gruppe). Nach der B1R-Blockade blieb die erwartete posttraumatische Hochregulation nach Trauma aus. So entsprach die relative Genexpression von ET-1 im Bereich der Hirnläsion nach einer Behandlung mit R-715 in etwa dem Genexpressionsniveau im Cortex der scheinläderten Tiere ($1 \pm 0,14$ vs. $1,1 \pm 0,13$, $n=5$ /Gruppe). Nach der B1R-Blockade kam es zu einer eindeutigen Unterdrückung der posttraumatischen Hochregulation der Genexpression von ET-1 in Relation zu der Placebo-Behandlung ($1 \pm 0,14$ vs. $3,1 \pm 0,42$, $n=5$ /Gruppe; $p < 0,05$). Eine Zusammenfassung der Werte ist in Abbildung 11 dargestellt.

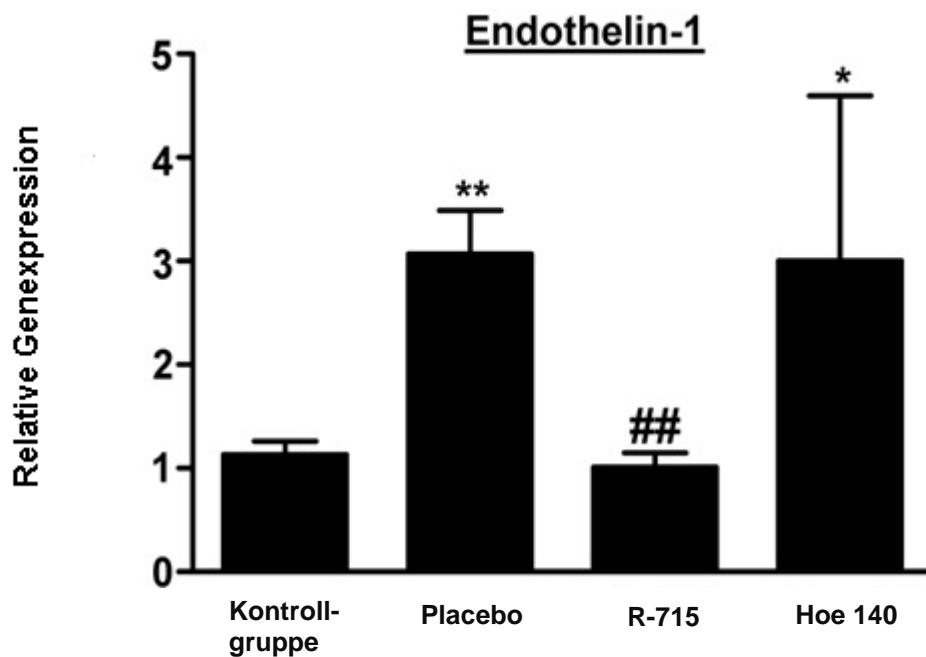


Abbildung 11:

B1R-Blockade unterdrückt die Hochregulation der mRNA-Expression von ET-1 nach Trauma

R-715: B1R-Antagonist, Hoe140: B2R-Antagonist.

* $p \leq 0,05$ im Vergleich zu der B2R-Blockade

$p \leq 0,05$ im Vergleich zu der Placebo-behandelten Läsionsgruppe (Placebo).

** $p \leq 0,05$ Im Vergleich der Hochregulation der mRNA-Expression von ET-1 bei Placebobehandlung nach Trauma im Vergleich zu den scheinläderten Tieren (Kontrollgruppe).

3.6.2 Interleukin-1 β (IL-1 β)

Das IL-1 ist ein entzündungsfördernder Signalmediator, der von Makrophagen, Endothelzellen, Fibroblasten und einigen anderen Zellen gebildet wird. Durch seine Wirkung können die Endothelzellen verdrängt werden, und die Leukozyten können durch die Basallamina ungehindert hindurchtreten (Ramzi et al. 1999, Banks et al. 1995, Fabry et al. 1994, Giulian et al. 1985).

In unseren Versuchen zeigte sich bei den lädierten Mäusen nach einer Placebo-Behandlung mit NaCl 0,9% eine Hochregulation der mRNA-Expression von IL-1 β im Läsionsbereich. Nach einer B1R-Blockade blieb diese Hochregulation aus. Die Genexpressionswerte lagen bei den lädierten Mäusen nach einer B1R-Blockade bei $1,3 \pm 0,6$ (n=5) gegenüber $44,3 \pm 24$ (n=5) nach einer Placebo-Behandlung mit NaCl 0,9% ($p \leq 0,05$). Nach einer B2R-Blockade zeigte sich, wie nach NaCl 0,9% Placebo-Behandlung, eine Hochregulation der Genexpression von IL-1 β . Hier lag die mRNA-Expression von IL-1 β bei $44,8 \pm 38,8$ (n=5), während die scheinlädierten Tiere eine mRNA-Expression desselben von $1,1 \pm 0,3$ (n=5) aufwiesen.

Zusammengefasst wurde die posttraumatische Hochregulation der mRNA-Expression von IL-1 β nach einer Kinin–B1R-Blockade unterdrückt. Das Expressionsniveau von IL-1 β bei den lädierten Tieren entsprach nach einer B1R-Blockade dem Niveau der Genexpression bei den scheinlädierten Tieren. Im Gegensatz dazu blieb die mRNA-Expression von IL-1 β nach einer B2R-Blockade oder Placebo-Behandlung mit NaCl 0,9% unbeeinflusst (**Abbildung 12**).

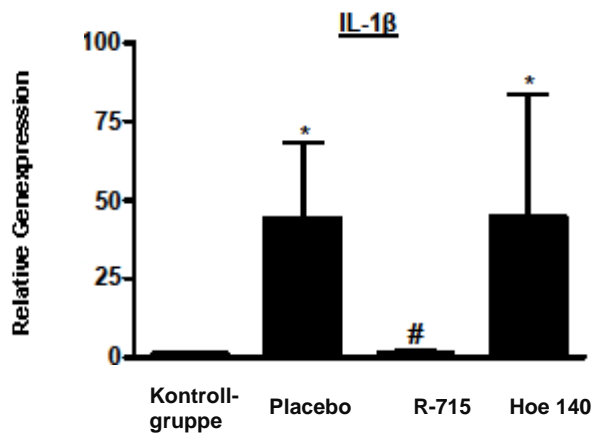


Abbildung 12:

B1R-Blockade unterdrückt die Hochregulation der mRNA-Expression von IL1 β nach Trauma

R-715: B1R-Antagonist, Hoe140: B2R-Antagonist.

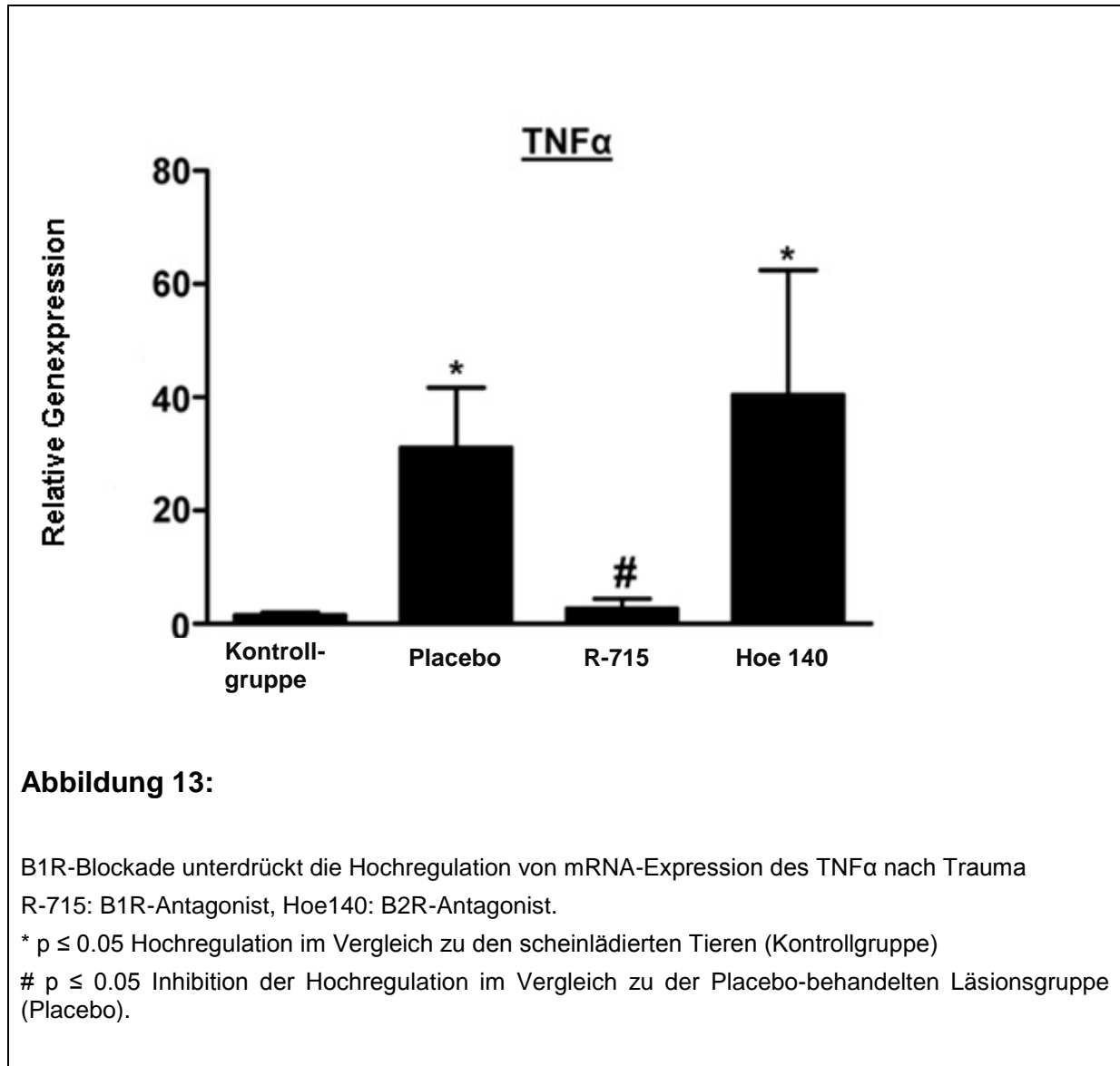
* $p \leq 0,05$ im Vergleich Hochregulation bei der Kontrollgruppe zu den scheinläderten Tieren (Kontrollgruppe)

$p \leq 0,05$ im Vergleich zu der Placebo-behandelten Läsionsgruppe (Placebo).

3.6.3 Tumornekrosefaktor- α (TNF α)

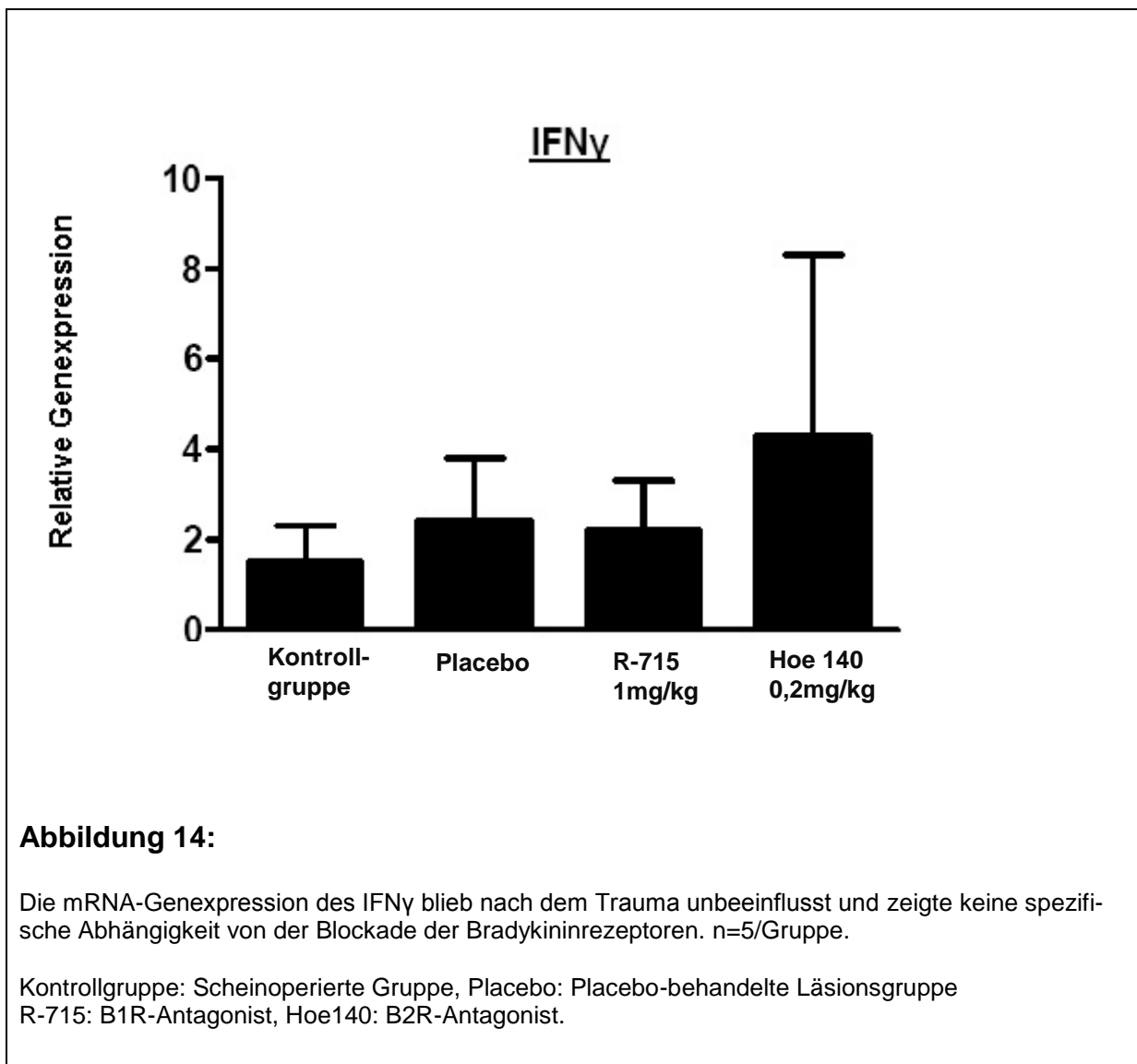
In unseren Versuchen ist die posttraumatische Genexpression des TNF α nach einer B1R-Blockade im Vergleich zu den scheinläderten Tieren nur minimal angestiegen. Die TNF- α wurde damit ähnlich beeinflusst wie bei ET-1 und IL-1 β . Die mRNA-Expression von TNF α in den scheinläderten Tieren lag bei $1,5 \pm 0,5$ (n=5), in den läderten WT-Tieren mit anschließender B1R-Blockade bei $2,7 \pm 1,7$ (n=5). Im Vergleich dazu lag diese bei den läderten WT-Tieren mit Placebo-Behandlung bei $31,1 \pm 10,6$ (n=5) und bei den läderten WT-Tieren mit anschließender B2R-Blockade bei $40,4 \pm 22$ (n=5) (**Abbildung 13**).

Es lässt sich postulieren, dass nach der B1R-Blockade die Hochregulation der TNF α -Genexpression nur in geringem Ausmaß nachweisbar war. Dies lässt eine Inhibition der TNF α -Genexpression durch die B1R-Blockade vermuten.



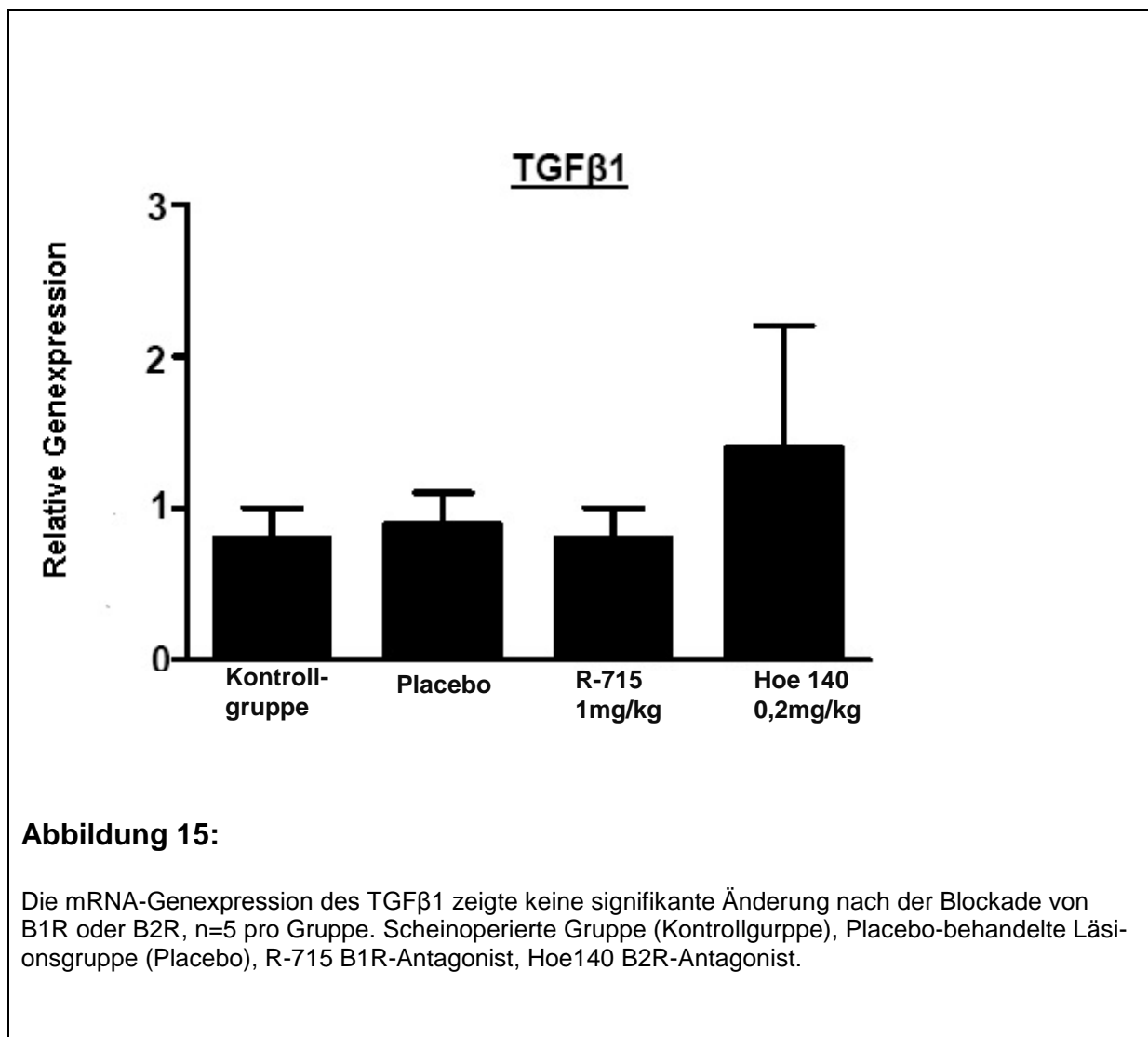
3.6.4 Interferon γ (IFN γ)

In den weiteren Experimenten lag die mRNA-Genexpression des IFN γ der scheinläderten Tieren bei $1,5 \pm 0,8$ (n=5), der läderten WT-Mäusen nach Placebobehandlung bei $2,4 \pm 1,4$ (n=5), nach B2R-Blockade bei $4,3 \pm 4$ (n=5) und nach B1R-Blockade bei $2,2 \pm 1,1$ (n=5). Insgesamt blieb das Verhalten der mRNA-Genexpression des IFN γ nach der B1R-Blockade unbeeinflusst (**Abbildung 14**).



3.6.5 Transforming Growth Faktor- β 1 (TGF β 1)

Die mRNA-Genexpression von TGF β 1 blieb unter der B1R-Blockade unbeeinflusst. Sie lag bei den Mäusen mit einer Scheinläsion bei $0,8 \pm 0,2$ (n=5), bei den lädierten Wildtyp-Mäusen nach Placebobehandlung bei $0,9 \pm 0,2$ (n=5), bei den lädierten Wildtyp-Mäusen nach B2R-Blockade bei $1,4 \pm 0,8$ (n=5) und bei den lädierten Wildtyp-Mäusen nach B1R-Blockade bei $0,8 \pm 0,2$ (n=5) (**Abbildung 15**). Insgesamt konnte kein signifikanter Einfluß der B1R-Blockade auf die mRNA-Genexpression des TGF β 1 nachgewiesen werden.



3.7 Immunhistochemie

Bei der immunhistochemischen Färbung hilft die Antigen-Spezifität von Antikörpern, bestimmte Antigene im histologischen Schnitt sichtbar zu machen. Bei dieser Untersuchungsmethode kommt es zur Identifizierung von bestimmten Antigenen im histologischen Schnitt, die spezifisch nur in bestimmten Zelltypen oder nur in bestimmten Geweben auftreten, damit werden die entsprechenden Zelltypen identifiziert.

In den vorliegenden Experimenten wurden beträchtlich mehr neutrophile Granulozyten, Makrophagen und T-Zellen in den Läsionsbereichen von B2R-KO-Mäusen und Wildtyp-Mäusen im Vergleich zu den Läsionsbereichen von B1R-KO-Mäusen dokumentiert. Die Erhebung der genauen Anzahl der Entzündungszellen war durch die Akkumulation derselben nicht möglich (**Abbildung 16**).

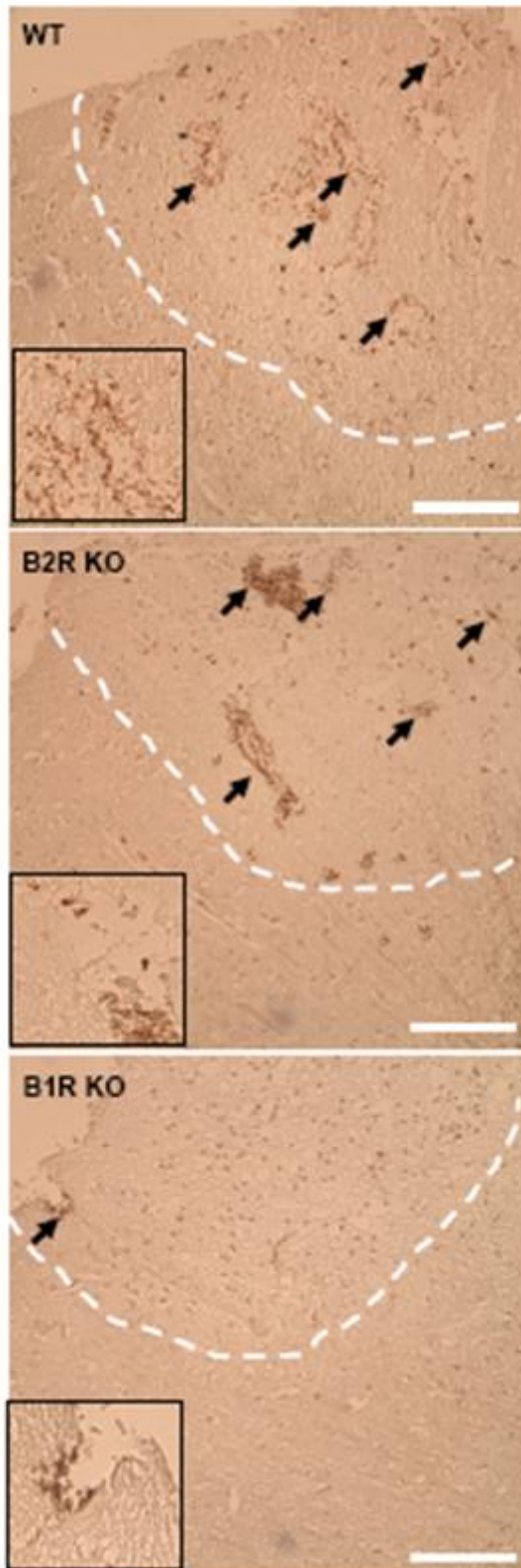


Abbildung 16:

Immunhistochemische Darstellung der infiltrierenden Makrophagen und der aktivierten Mikroglia im Läsionsbereich von WT, B1R-KO und B2R-KO Mäusen. Bei B1R-KO-Mäusen werden signifikant weniger Makrophagen und aktivierte Mikroglia im Läsionsbereich im Vergleich zu den Läsionsbereichen der WT-Tiere und der B2R-KO Tiere beobachtet. Die Erhebung der genauen Anzahl der Entzündungszellen war durch die Akkumulation der Zellen nicht möglich.

4 Diskussion

4.1 Kallikrein-Kinin-System

Durch die bekannten pathophysiologischen Eigenschaften der Kinine, z. B. ihr stark entzündungs- und schmerzinduzierendes Potential und ihre Beeinflussung der Blut-Hirn-Schranke, können diese körpereigenen bioaktiven Stoffe als wichtige Mediatoren des sekundären Hirnschadens agieren (Bhoola et al. 1992, Hall et al. 1992, Dray et al. 1993). In der vorliegenden Arbeit wurde der Effekt des Antagonismus der Bradykininwirkung durch die Rezeptorenblockade nach der fokalen Kälteläsion untersucht. Unterschiedliche Wirkungskomponenten und Zusammenhänge zum neuroprotektiven Effekt wurden analysiert.

4.2 Fokale Kälteläsion als Tiermodell des SHT

Die Durchführbarkeit dieser Experimente im Rahmen dieses Versuchsmodells der fokalen Kälteläsion ist einfach, standardisiert und gut reproduzierbar. Das Modell sichert einen hohen Grad an konsistenter Datenerhebung. Die Läsionsursache könnte dieses Tiermodell als Kritik auf sich ziehen, denn hierbei fehlt die mechanische Gewalteinwirkung auf das Gehirn, diese ist durch „zytotoxische“ (intrazelluläre) Ödemgenese charakterisiert (Unterberg et al. 1997). Insgesamt besteht nur eine bedingte direkte Übertragbarkeit auf die klinische Situation des Schädel-Hirn-Traumas. Die Auswirkung der Bradykininrezeptorantagonisten auf die Entwicklung des Hirnödems und die entstehende sekundäre Hirnschädigung konnten trotzdem anhand dieses Modells evaluiert werden.

4.3 Rolle der B1R bei der Entstehung des vasogenen Hirnödems

Mehrere Studien haben die pathophysiologische Rolle von Bradykinin-B1R bei einer zerebralen Schädigung nach einer Ischämie oder im Rahmen anderer pathophysiologischer Prozesse wie Entzündungsereignissen oder kardiovaskulärer Erkrankungen untersucht (Austin et al. 2009, McLean et al. 2000, Souza et al. 2004, Lagneux et al. 2002, Yin et al. 2007). Unter pathophysiologischen Bedingungen wie z. B. Schlaganfall, Entzündungsgeschehen oder anderen Ischämieereignissen wurde eine entscheidende Rolle der B1R u. a. bei der Entstehung und Entwicklung des postischämischen Ödems beschrieben. Bei einem Schädel-Hirn-Trauma begünstigt diese Wirkung die Entstehung von sekundären Hirn-

schädigungen. Die Blockade der B1R würde demnach zur signifikanten Verminderung des Hirnödems und damit zur Reduktion der sekundären Hirnschaden führen, wobei eine B2R-Blockade keine signifikante Änderung der pathophysiologischen Prozesse bewirken würde (Austin et al. 2009). Unsere Versuche konnten den Effekt einer B1R-Blockade zur Verminderung des Hirnödems und zur Reduktion der sekundären Hirnschädigung auch nach der fokalen Kälteläsion bestätigen. Die biochemischen bzw. molekularen Mechanismen, die die Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke kontrollieren und damit an der Entstehung des vasogenen Hirnödems beteiligt sind, sind nur wenig bekannt. Frühere Studien haben jedoch einen fördernden Einfluss des ET-1 bei der Ödementwicklung im Allgemeinen und bei der Entwicklung des Hirnödems im Besonderen nachgewiesen (Kirkby et al. 2008, Bardutzky et al. 2007, Iglarz et al. 2007, Ayata et al. 2002). Lo fand im Ischämie-Modell der Maus, dass die vermehrte ET-1-Expression eindeutig mit vermehrter Hirnödementwicklung und mit größeren Infarktarealen einherging (Lo et al. 2005). Im Einklang mit diesem Ergebnis kam es nach einer pharmakologischen Blockade der Endothelin-1-Rezeptoren zu einer signifikanten Verringerung der Hirnödementwicklung, der Ischämiefolgen und der Störung der Blut-Hirn-Schranke in der Ratte (Matsuo et al. 2001, Dawson et al. 1999, Moldes et al. 2008, Kossmann et al. 1996a, McClain et al. 1991). Die vorliegenden Ergebnisse konnten eine verminderte Hirnödementwicklung bei den lädierten Tieren nach einer B1R-Blockade passend zum Ausbleiben der Hochregulation der ET-1 mRNA nachweisen (**Abbildung 11**). Demgegenüber zeigten das vasogene Hirnödem und die mRNA-Expression des ET-1 in der RT-PCR-Analyse nach einer B2R-Blockade und nach Placebo-Behandlung mit 0,9%NaCl einen signifikanten Anstieg im Vergleich zu scheinoperierten Mäusen. Die erwartete posttraumatische Hochregulation der mRNA-Genexpression vasogener Zytokine IL-1 β und TNF α blieb ebenfalls nach der B1R-Blockade aus (**Abbildung 12 und 13**).

Das Ausbleiben der Hochregulation der mRNA-Genexpression vasogener Zytokine nach B1R-Blockade könnte einen weiteren Mechanismus auf molekularer Ebene zur Beeinflussung der Hirnödementwicklung darstellen.

4.4 Therapeutische Wirksamkeit der selektiven B1R-Blockade beim vasogenen Hirnödem

In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass durch eine selektive B1R-Blockade eine wirksame Reduktion des posttraumatischen vasogenen Hirnödems erreicht wird. Mit Hilfe der fokalen Kälteläsion war es möglich, die Wirkung der selektiven B1R-Blockade unter standardisierten Versuchsbedingungen auf das vasogene Hirnödem zu untersuchen. Die gewebeprotective Rolle der B1R-Blockade wurde bereits in unterschiedlichen Fragestellungen wie beim Schlaganfall (Austinat et al. 2009), Herzinfarkt (Lagneux et al. 2002, Yin et al. 2007), intestinaler Ischämie (McLean et al. 2000, Souza et al. 2004) und im Rahmen entzündlicher Reaktionen (Ahluwalia et al. 2004) nachgewiesen. Hierbei konnte durch eine B1R-Blockade eine eindeutige Gewebeprotektion erreicht werden. Quintaó beschrieb sogar eine schmerzinduzierende Wirkung der B1R bei der Wahrnehmung von neuropathischen Schmerzen (Quintaò et al. 2008).

Durch die kompetitive B1R-Blockade mit dem selektiven B1R-Antagonisten R-715 eine Stunde nach der Traumainduktion konnte die Entwicklung des vasogenen Hirnödems eindeutig abgeschwächt werden. Damit konnten die Sekundärschäden und letzten Endes das Läsionsvolumen nach einer fokalen Kälteläsion des Maushirns signifikant reduziert werden. Als Erfolgskriterien wurden eine Reduktion der Ödementwicklung und eine Verringerung des Läsionsvolumens betrachtet. Eine signifikante Reduktion des Läsionsvolumens fand sich nach einer B1R-Blockade auf etwa ein Viertel im Vergleich zu der Placebo-Behandlung. Bezüglich der Entwicklung des Hirnödems wurde die EB-Extravasation bzw. die EB-Ausbreitung im Hirngewebe quantifiziert und ausgewertet. Des Weiteren zeigte sich nach der B1R-Blockade eine signifikante Verringerung der Hirnödementwicklung (EB-Extravasation bzw. EB-Ausbreitung) nach der Kälteläsion um ca. 50% im Vergleich zu den lädierten Tieren, die eine Placebo-Behandlung mit 0,9% NaCl oder eine B2R-Blockade erfuhren.

Eine Reduktion der Sekundärschäden und damit der gesamten Hirnschädigung durch die Verringerung des Hirnödems in diesem Ausmaß wäre für Patienten mit schwerem Schädelhirntrauma eine mögliche Option für eine Reduktion der funktionellen neurologischen Defizite. Unsere Versuche konnten die pathophysiologische Rolle der B1R im Rahmen des Schädelhirntraumas im Modell der fokalen Kälteläsion

belegen. Hierbei konnten das Hirnödem und der Hirnschaden alleine durch die einmalige i.v. Gabe von B1R-Antagonisten R-715 1 mg/kg KG eine Stunde nach dem Trauma signifikant reduziert werden. Bereits unter dieser einmaligen Verabreichung wurde ein relevanter neuroprotektiver Effekt erreicht.

4.5 Rolle der B1R bei der Entstehung der lokalen Entzündungsreaktion

Die verstärkte Präsenz von entzündungsspezifischen Zytokinen bei Patienten mit Schädel-Hirn-Trauma im Plasma und im Liquor scheint eine ursächliche Rolle für die Entstehung sekundärer Hirnschädigung zu haben (Kossmann et al. 1995, Kossmann et al. 1996a, Kossmann et al. 1997, Morganti-Kossmann et al. 1997). Die Hochregulation der B1R unter inflammatorischen Reaktionen war von einer Stimulation der Produktion von IL-1 β begleitet (Pan et al. 1996). Auch die vorliegenden Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchung (**Abbildung 16**) unterstreichen die Theorie, dass Bradykinin über die B1R in Vermittlung der Entzündungsreaktionen nach Neurotrauma eine wesentliche Bedeutung aufweist. In diesem Zusammenhang wurden deutlich weniger Entzündungszellen in den Läsionsbereichen von B1R-KO Mäusen im Vergleich zu den Läsionsbereichen der Wildtyp- oder B2R-KO Mäusen nachgewiesen. Ähnliche immunhistochemische Ergebnisse wurden bei den Untersuchungen der inflammatorischen Reaktionen nach einer Hirnischämie im Schlaganfall-Modell festgestellt (Austinat et al. 2009).

Im Rahmen einer anderen Untersuchung wurde bei inflammatorischen Reaktionen das Ausbleiben der Hochregulation der mRNA-Genexpression von B1R nach einer Inkubation mit Glukokortikoiden z. B. Dexamethason, aber auch durch die Inkubation mit Proteinsyntheseinhibitoren (z. B. Cyclohexamid) beobachtet (Ni et al. 1998). Ferner wurde eine physiologische Interaktion zwischen IL-1, IL-6 und TNF α mit dem neuroendokrinen System nachgewiesen. Diese Zytokine induzieren die Freisetzung des „corticotropin-releasing factor“ (CRF) im Hypothalamus, der wiederum die Synthese von Adrenocorticotropin in der Hypophyse stimuliert (Goodman et al. 1990, Mazue et al. 1992, Gourin et al. 1997, Berkenbosch et al. 1987, Karalis et al. 1991, Naitoh et al. 1988). Sowohl der quantitative Nachweis in den vorliegenden Ergebnissen als auch die Komplexität des beteiligten Zytokinnetzwerks legt die Vermutung nahe, dass das Ausbleiben der Hochregulation von proinflammatorischen Zytokinen nach der B1R-Blockade mit der Abschwächung der posttraumatischen Entzündungs-

reaktion im Zusammenhang steht. Auch über diese Wirkungsebene könnte die B1R-Blockade zur Neuroprotektion beitragen.

4.6 B1R-Blockade versus B2R-Blockade

Einzelne Arbeitsgruppen wie Görlach und Hellal im Trauma-Modell und Zausinger im Ischämie-Modell (Görlach et al. 2001, Hellal et al. 2003, Zausinger et al. 2002) haben eine neuroprotektive Wirkung über eine B2R-Blockade beschrieben. Hier sind die unterschiedlichen Modelle, Präparate und Versuchsbedingungen zu berücksichtigen. Görlach und Zausinger (Görlach et al. 2001, Zausinger et al. 2002) haben die Gabe der B2R-Antagonisten schon vor der Läsionsinduktion bzw. vor der Ischämie begonnen. Zu dieser Zeit ist unter physiologischen Bedingungen die Expression der B1R - wenn überhaupt - nur in einem sehr geringen Ausmaß nachweisbar, dafür wurde eine dominierende Expression der B2R beschrieben (Raslan et al. 2010). Im Gegensatz dazu wurde eine beträchtliche Expressionsinduktion der B1R direkt nach einer Gewebsverletzung beobachtet (Schanstra et al. 1998). In der vorliegenden Arbeit wurden in der frühen Phase vier Stunden nach Trauma eine Induktion und Dominanz der B1R, aber zu späteren Zeitintervallen eine Dominanz der B2R beobachtet (**Abbildung 6**). Dies könnte die unterschiedlichen Ergebnisse nach kontinuierlicher Gabe der B2R-Antagonisten über die ersten 24 Stunden erklären. Insgesamt hat die B1R-Blockade in den vorliegenden Ergebnissen einen signifikant größeren neuroprotektiven Effekt als die B2R-Blockade bei den Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen (Görlach et al. 2001, Hellal et al. 2003, Zausinger et al. 2002). Bei den verschiedenen Versuchsbedingungen kann keine Aussage getroffen werden, ob hier ein Widerspruch zu den Ergebnissen der genannten Arbeitsgruppen vorliegt.

Weitere Untersuchungen sind notwendig, um die bisher unklaren Zusammenhänge zwischen der kontinuierlichen Verabreichungsmethode der B2R-Blockade und dem neuroprotektiven Effekt der B2R-Blockade zu klären. Eine interessante Untersuchung wäre der Vergleich des neuroprotektiven Effektes bei einer kontinuierlichen Verabreichung mit der neuroprotektiven Wirkung nach einer einmaligen Dosisgabe des B2R-Antagonisten nach Trauma. Ein anderer Gesichtspunkt wäre die Untersuchung des Effektes einer kombinierten Therapie mit B1R-Blockade eine Stunde postoperativ mit anschließender kontinuierlicher B2R-Blockade über die nächsten 24 Stunden ent-

sprechend der Kininrezeptorendominanzphase nach der mRNA-Genexpression (**Abbildung 6**).

Zusammenfassend bestätigen unsere Versuche die zentrale Mediatorenrolle des Kinin-systems in der Entwicklung der posttraumatischen Sekundärschädigung des Gehirns. Die selektive B1R-Blockade stellt einen potentiellen kausalen Therapieansatz des posttraumatischen vasogenen Hirnödems dar. Ferner sind weitere Untersuchungen notwendig, um die langfristige Beeinflussung der posttraumatischen neurologischen Funktionen zu evaluieren.

4.7 Zusammenfassung

Das Ziel der Traumaforschung ist das Minimieren der posttraumatischen sekundären Hirnbeeinträchtigung. Mit einem spezifischen therapeutischen Konzept soll das traumatische Hirnödem und damit die entstehenden sekundären Hirnschäden minimiert werden. Damit bleiben die Traumafolgen zum größten Teil von der Ausdehnung der Primären Hirnschäden abhängig und dadurch verbessert sich die Gesamtprognose von Traumapatienten.

Aus diesem Grund steht die Therapie des traumatischen Hirnödems, des intrakraniellen Druckes und die Antagonisierung neurotoxischer Mediatoren im Mittelpunkt des Interesses bei der Therapie des Schädel-Hirn-Traumas. Vor diesem Hintergrund wurde in der vorliegenden Arbeit in einem experimentellen Schädel-Hirn-Trauma-Modell der fokalen Kälteläsion bei der Maus die Effektivität der B1R-Blockade untersucht. Die Ergebnisse dieser Untersuchung dokumentierten auf der Suche nach einer grundlegenden spezifischen Therapie des vasogenen traumatischen Hirnödems die B1R-Blockade als einen potentiellen Ansatz zu Reduktion der sekundären Hirnschäden. Zum Einen konnte durch die selektive Blockade von B1R mit dem Präparat R-715 nach einer fokalen Kälteläsion im Mausmodell die Hirnschädigung um etwa 75 % gegenüber den Tieren der Kontrollgruppen reduziert werden. Zum Anderen lässt sich nach der B1R-Blockade u. a. eine signifikante Abschwächung des vasogenen Hirnödems um etwa 50 % im Vergleich zu den Tieren der Kontrollgruppen feststellen. Die Reduktion der sekundären Hirnschädigung durch die B1R-Blockade 24 Stunden nach der Läsionsinduktion macht die selektive B1R-Blockade als kausaler Therapieansatz eine interessante Behandlungsoption des posttraumatischen vasogenen Hirnödems.

Nach jeder wissenschaftlichen Untersuchung entstehen neue interessante Fragen bezüglich der errungenen Ergebnisse. Wie werden die langfristigen Sekundärschäden nach der B1R-Blockade aussehen? Inwiefern können die vorliegenden Ergebnisse der B1R-Blockade nach einer fokalen Kälteläsion auf die Hirnschädigung nach mechanischen Traumaläsionen übertragen werden? Wie würden das menschliche Nervengewebe im Allgemeinen und das menschliche Gehirn im Besonderen nach Trauma auf diese B1R-Blockade reagieren?

Weitere Untersuchungen sind auf jeden Fall erforderlich, um die noch offenen Diskussionspunkte zu behandeln und befriedigende Antworten zu finden. Erst dann können die gewonnenen Erkenntnisse in den klinischen Einsatz im geeigneten Rahmen umgesetzt werden.

4.8 Schlussfolgerung

Die vorliegende Arbeit stellt mit der posttraumatischen selektiven B1R-Blockade einen potentiellen kausalen Therapieansatz des posttraumatischen vasogenen Hirnödems nach Schädel-Hirn-Trauma fest.

5. Abbildungsverzeichnis:

- Abb. 1: Die Pathophysiologie der Entwicklung sekundärer Hirnschaden nach Schädel-Hirn-Trauma oder nach einer Hirnischämie.
- Abb. 2: Aktivierungskette des Kallikreinkininsystems.
- Abb. 3: Mausschädel in der Aufsicht: Läsionsstelle.
- Abb. 4: Kältesonde zur Applikation der Kälteläsion.
- Abb. 5: Die in unseren Versuchen verwendete stereotaktische Halterung.
- Abb. 6: Relative Genexpression der Bradykininrezeptoren (B1R und B2R) zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Trauma.
- Abb. 7: Läsionsvolumenvergleich in B1R-KO-Mäusen, B2R-KO-Mäusen und Wildtyp-Mäusen.
- Abb. 8: In der Hämatoxylin-Eosin-Färbung.
- Abb. 9: Läsionsvolumenvergleich in Wildtyp-Mäusen bei B1R-Blockade vor der Läsionsinduktion, B1R-Blockade eine Stunde nach der Läsionsinduktion B2R-Blockade eine Stunde nach der Läsionsinduktion, 0,9 % NaCl-Injektion eine Stunde nach der Läsionsinduktion.
- Abb. 10: Evans Blau-Extravasation nach dem Trauma.
- Abb. 11: Relative Genexpression des Endothelin-1 (ET-1) nach Trauma.
- Abb. 12: Relative Genexpression des Interleukin-1 β (IL-1 β) nach Trauma.
- Abb. 13: Die relative Genexpression des Tumornekrosefaktor- α (TNF α) nach fokaler kortikaler Kälteläsion im Läsionsbereich.
- Abb. 14: Relative Genexpression des Interferon γ (IFN γ) nach Trauma.
- Abb. 15: Relative Genexpression des Transforming Growth Faktor- β 1 (TGF β 1) nach Trauma.
- Abb. 16: Immunhistochemische Darstellung des Läsionsbereiches bei B1R-KO, B2R-KO und WT-Mäusen 1 Stunde nach Läsionsinduktion.

6. Literaturverzeichnis

Abelous, J.E., Bardier, E. (1909): Les substances hypotensives de l'urine humaine normale. CR Soc. Biol. 66:511-20.

Adams, J.H. (1984): Head injury. In: Hume- Adams, J., Corsellis, JAN, Duchen, L.W., (eds.), Greenfields's Neuropathology, 4th edition, S. 85-124. Edward Arnold, London.

Adams, J.H., Mitchell, D.E., Graham, D.L., Doyle, D. (1977): Diffuse brain damage of intermediate impact type. Brain 100: 489-502.

Ahluwalia, A., Foster, P., Scotland, R.S., McLean, P.G., Mathur, A., Perretti, M., Moncada, S., Hobbs, A.J. (2004): Antiinflammatory activity of soluble guanylate cyclase; cGMP-dependent downregulation of P-selectin expression and leukocyte recruitment. Proc. Natl. Acad. Sci. U .S. A.:101:1386-91.

Ahluwalia, A., Perretti, M. (1996): Involvement of bradykinin B1 receptors in the polymorphonuclear leukocyte accumulation induced by IL-1 β in vivo in the mouse. J. Immunol. 156: 269–274.

Araujo, R.C., Kettritz, R., Fichtner, I., Paiva, A.C.M., Pesquero, J.B., Bader, M. (2001): Altered neutrophil homeostasis in kinin B1 receptordeficient mice. Biol. Chem. 382: 91–95.

Astrup, J., Siesjo, B.K., Symon, L. (1981): Thresholds in Cerebral Ischemia - the Ischemic Penumbra. Stroke 12:723-725.

Austin, C.E., Faussner, A., Robinson, H.E., Chakravarty, S., Kyle, D.J., Bathon, J.M., Proud, D., (1997): Stable expression of the human kinin B1 receptor in Chinesehamster ovary cells. Characterization of ligand binding and effector pathways. J. Biol.Chem. 272: 11420-11425.

Austinat, M., Braeuninger, S., Pesquero J.B., Brede, M., Bader, M., Stoll, G., Renné, T., Kleinschnitz C. (2009): Blockade of bradykinin receptor B1 but not bradykinin receptor B2 provides protection from cerebral infarction and brain edema. *Stroke* 40:285-93.

Ayata, C., Ropper, A.H. (2002): Ischaemic brain oedema. *J. Clin. Neurosci.* 9: 113–124.

Baethmann, A., Kempfski, O. (1992): Biochemical factors and mechanisms of secondary brain damage in cerebral ischemia and trauma. Neurochemical correlates of cerebral ischemia. In: *Advances in Neurochemistry 7*, (eds.) Bazan, N.G., Braquet, P., Ginsberg, M.D., S: 295-320 Plenum Press New York.

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

Baethmann, A., (1985): Steroids and brain function. In *Brain Insults in Infants and Children: Pathophysiology, Diagnosis and Acute Management* (James, H.E., Anas, N.G., Perkin, R.M., eds.), S: 3-17 Grune & Stratton, Orlando.

Baethmann, A., Oettinger, W., Rothenfusser, W., Kempfski, O., Unterberg, A., Geiger, R. 1980: Brain edema factors: current state with particular reference to plasma constituents and glutamate. *Adv. Neurol.* 28: 171-195.

Baethmann, A., Kempfski, O., Unterberg, A., Maier-Hauff, K., Lange, M., Schürer, L. (1982): [Origin and Therapy of Secondary Cerebral Damage]. *MMW Münch. Med. Wochenschr.* 124:941-944.

Baethmann, A. (1978): Pathophysiological and pathochemical aspects of cerebral edema. *Neurosurg. Rev.* 1: 85-100.

Banks, W.A., Kastin, A.J., Durham, D.A. (1989): Bidirectional transport of interleukin-1 across blood-brain barrier. *Brain Res. Bull* 23.:433–437.

Barthon, J.M., and Proud, D. (1991): Bradykinin antagonists. *Ann. Rev. Pharmac. Toxic.* 31: 129-162.

Barzó, P., Marmarou, A., Corwin, F., und Dunbar, J. G. (1997): Acute blood-brain barrier changes in experimental closed head injury as measured by MRI and gd-dtpa. *Acta Neurochir. Suppl.* 70, Seite 243-246.

Bazan, N.G., Rodriguez de Turco, E.B., Allan, G. (1995): Mediators of Injury in Neurotrauma. Intracellular Signal Transduction and Gene Expression. *J. Neurotrauma* 12:791-814.

Berkenbosch, F., van Oert, J., Del Ray, A., Tilders, F., Besedovsky, H. (1987): CRF-producing neurons in the rat are activated by interleukin-1. *Science* 238:524–525.

Berridge, M.J. (1993): Inositol trisphosphate and calcium signalling. *Nature* 361: 315–325.

Bhoola, K. D., Figueroa, C. D., Worthy, K. (1992): Bioregulation of kinins: kallikreins, kininogens, and kininases. *Pharmacol. Rev.* 44: 1–80.

Bhoola, K. D., Evans, R. H., Forster, M. R. (1987): Excitatory effect of bradykinin on spinal neurones. *Br. J. Pharmacol.* 90: 1-15.

Blaukat, A., Micke, P., Kalatskaya, I., Faussner, A., Müller-Esterl, W. (2003): Down-regulation of bradykinin B2 receptor in human fibroblasts during prolonged agonist exposure. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 284: 1909–1916.

Bönner, G. (1985): Ganten, D., Ritz, E. (Hrg) *Lehrbuch der Hypertonie.* S. 231-242. Schattauer Verlag, Stuttgart.

Bardutzky, J., Schwab, S. (2007): Antiedema therapy in ischemic stroke. *Stroke* 38: 3084 –3094.

Bredesen, D. E. (1995): Neural Apoptosis. *Ann. Neurol.* 38: 839-851.

Brionne, T. C., Tesseur, I., Masliah, E., Wyss-Coray, T. (2003) Loss of TGF-beta 1 leads to increased neuronal cell death and microgliosis in mouse brain. *Neuron* 40: 1133-1145.

Bullock, R. (1995a): Strategies for neuroprotection with glutamate antagonists. Extrapolating from evidence taken from the first stroke and head injury studies. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 765: 272-278.

Burt, D. W., Law, A. S. (1994): Evolution of the transforming growth factor-beta superfamily *Prog. Growth Factor Res.* 5: 99-118.

Butt, A. M., Jones, H. C., Abbott, N. J. (1990): Electrical resistance across the blood-brain barrier in anaesthetized rats, a developmental study. *J. Physiol.* 429: 47-62.

Carretero, O. A., Scicli, A. G. (1980): The renal kallikrein-kinin system. *Am. J. Physiol.* 238: 247-255.

Cayla, C., Todiras, M., Iliescu, R., Saul, V. V., Gross, V., Pilz, B., Chai, G., Merino, V. F., Pesquero, J. B., Baltatu, O. C., Bader, M. (2007): Mice deficient for both kinin receptors are normotensive and protected from endotoxin-induced hypotension. *FASEB J.* 21: 1689–1698.

Cerf, M. E., Raidoo, D. M. (2000): Immunolocalization of plasma kallikrein in human brain. *Metab. Brain* 15: 315-323.

Chesnut, R. M., Marshall, S.B., Piek, J. (1993): Early and late systemic hypotension as a frequent and fundamental source of cerebral ischemia following severe head injury in the Traumatic Coma Data Bank. *Acta Neurochir. Suppl.* 59: 121-125.

Chao, J., Woodley, C., Chao, L., Margolius, H. S. (1983): Identification of tissue kallikrein in brain and in the cell-free translation product encoded by brain mRNA. *J. Biol. Chem.* 258: 15173-15178.

Clasen, R. A., Brown, D. V., Leavitt, S., Hass, G. M. (1953): The Production by Liquid Nitrogen of Acute Closed Cerebral Lesions. *Surg. Gynecol. Obstet.* 96: 605-616.

Clendenon, N. R., Allen, N., Ito, T., Gordon, W. A., Yashon, D. (1978): Response of Lysosomal Hydrolases of Dog Spinal Cord and Cerebrospinal Fluid to Experimental Trauma. *Neurology* 28: 78-84.

Correa, F. M., Innis, R. B., Uhl, G. R., Snyder, S. H. (1979): Bradykinin-like immunoreactive neuronal systems localized histochemically in rat brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 76: 1489-93.

Cotran, R., Kumar, V., Collins, T., Robbins, S. (1999): *Pathologic Basis of Disease*. 6. Auflage. W. B. Saunders, London, ISBN: 978-0721673356.

D'Agostino, R. B. (1986) "Tests for Normal Distribution" in *Goodness-Of-Fit Techniques* edited by RB D'Agostino and MA Stepenes, Macel Decker,

Dawson, D. A., Sugano, H., McCarron, R. M., Hallenbeck, J. M., Spatz, M. (1999): Endothelin receptor antagonist preserves microvascular perfusion and reduces ischemic brain damage following permanent focal ischemia. *Neurochem. Res.* 24: 1499 –1505.

De Sampaio e Spohr, T. C., Martinez, R., da Silva, E. F., Neto, V. M., Gomes, F. C. (2002): Neuro-glia interaction effects on GFAP gene: a novel role for transforming growth factor-beta1. *Eur.J.Neurosci* 16: 2059-2069.

De Sousa Buck, H., Ongali, B., Thibault, G., Lindsey, C. J., Couture, R. (2002) Autoradiographic detection of kinin receptors in the human medulla of control, hypertensive, and diabetic donors. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 80: 249-257.

Dirnagl, U., Meisel, A. (1999b): *Zerebrale Ischämie*. Ganten, D. (Hrsg.) *Handbuch der molekularen Medizin*, Band 5. Berlin, Deutschland: Springer Verlag: S. 510-533.

Dirnagl, U., Iadecola, C., Moskowitz, M. A. (1999): Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends Neurosci.* 22: 391-397.

D'Orleans-Juste, P., De Nucci, G., Vane, J. R. (1989): Kinins act on B1 and B2 receptors to release conjointly endothelium-derived relaxing factor and prostacyclin from bovine aortic endothelial cells. *Br. J. Pharmacol.* 96: 920-926.

Dray A., Perkins, M. N. (1993): Bradykinin and inflammatory pain. *Trends Neurosci.* 16: 99-104.

Ehrenfeld, P., Millan, C., Matus, C. E., Figueroa, J. E., Burgos, R. A., Nualart, F., Bhoola, K. D., Figueroa, C. D. (2006): Activation of kinin B1 receptors induces chemotaxis of human neutrophils. *J. Leukoc. Biol.* 80: 117-124.

Erdös, E. G. (1979): Bradykinin, kallidin and kallikrein. *Handbook Exp Pharmacol* 25 Suppl, Springer, Heidelberg. S: 768.

Eriskat, J., Schürer, L., Kempfski, O., Baethmann, A. (1994): Growth kinetics of a primary brain tissue necrosis from a focal lesion. *Acta Neurochir. Suppl.* 60: 425-427.

Ertel, W., Keel, M., Stocker, R. (1997): Detectable concentrations of Fas ligand in cerebrospinal fluid after severe head injury. *J. Neuroimmunol* 80: 93-96.

Fabry, Z., Raine, C. S., Hart, M. N. (1994): Nervous tissue as an immune compartment: the dialect of the immune response in the CNS. *Immunol. Today* 15: 218-224.

Faussner, A., Bathon, J. M., Proud, D. (1999): Comparison of the responses of B1 and B2 kinin receptors to agonist stimulation. *Immunopharmacol.* 45: 13-20.

Francel, P. C. (1992): Bradykinin and neuronal injury. *J. Neurotrauma* 9(Suppl 1): 27-45.

Parpura, V., Basarsky, T. A., Liu, F., Jeftinija, K., Jeftinija, S., Haydon, P. G. (1994): Glutamate-mediated astrocyte-neuron signalling. *Nature* 369: 744-747.

Frey, E. K. (1926): Zusammenhänge zwischen Herzarbeit und Nierentätigkeit. Arch. Klin. Chir. 142: 633–669.

Frey, E. K., Kraut, H. (1928): Ein neues Kreislaufhormon und seine Wirkung. Arch. Exp. Pathol. Pharmacol. 133: 1-56.

Galie, N., Manes, A., Branzi, A. (2004): The endothelin system in pulmonary arterial hypertension. Cardiovasc. Res. 61: 227-237.

Gentry, L. R. (1994): Imaging of closed head injury. Radiology 191: 1–17.

Giulian, D., Lachman, L. B. (1985): Interleukin-1 stimulation of astroglial proliferation after brain injury. Science 228: 497–499.

Gobeil, F., Neugebauer, W., Filteau, C., Jukic, D., Allogho, S. N., Pheng, L. H., Nguyen-Le, X. K., Blouin, D., Regoli, D. (1996): Structure-activity studies of B1 receptor-related peptides. Antagonists. Hypertension. 28: 833– 839.

Görlach, C., Hortobágyi, T., Hortobágyi, S., Benyó, Z., Relton, J., Whalley, E. T., Wahl, M. (2001): Bradykinin B2, but not B1, receptor antagonism has a neuroprotective effect after brain injury. J. Neurotrauma 18: 833-838.

Goodman, J. C., Robertson, C. S., Grossman, R. G., Narayan, R. K. (1990): Elevation of tumor necrosis factor in head injury. J. Neuroimmunol. 30: 213–217.

Gourin, G. G., Shackford, S. R. (1997): Production of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1 beta by human cerebral microvascular endothelium after percussive trauma. J. Trauma 42: 1101–1107.

Graham, D.I., Adams, J.H., Doyle, D. (1978): Ischaemic Brain Damage in Fatal Non-Missile Head Injuries. J. Neurol. Sci. 39: 213-234.

Graham, D. I. Ford, I., Adams, J. H., Doyle, D., Teasdale, G. M., Lawrence, A. E., McLellan, D. R. (1989): Ischemic brain damage is still common in fatal non-missile head injury. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiat.* 52: 346-50.

Greve, M. W., Zink, B. J. (2009): Pathophysiology of traumatic brain injury. *Mt. Sinai J. Med.* 76:97-104.

Hall, J. M. (1992): Bradykinin receptors: pharmacological properties and biological roles. *Pharmacol. Ther.* 56: 131-190.

Hehlgans, T., Pfeffer, K. (2005): The intriguing biology of the tumour necrosis factor/tumour necrosis factor receptor superfamily: players, rules and the games. *Immunology* 115:1-20.

Hellal, F., Pruneau, D., Palmier, B., Faye, P., Croci, N., Plotkine, M., Marchand-Verrecchia, C. (2003): Detrimental role of bradykinin B2 receptor in a murine model of diffuse brain injury. *J. Neurotrauma* 20: 841-851.

Hilton, S. M., Torres, S. H. (1970): Selective hypersensitivity to bradykinin in salivary glands with ligated ducts. *J. Physiol.* 211: 37-48.

Holmin, S., Mathiesen, T., Shetye, J., Biberfeld, P. (1995): Intracerebral inflammatory response to experimental brain contusion. *Acta Neurochir.* 132:110–119.

Hunter, K. E., Sporn, M. B., Davies, A. M. (1993): Transforming growth factor-betas inhibit mitogen-stimulated proliferation of astrocytes. *Glia* 7: 203-211.

Iglarz, M., Clozel, M. (2007): Mechanisms of ET-1-induced endothelial dysfunction. *J Cardiovasc. Pharmacol.* 50: 621– 628.

Isaacs, A., Lindenmann, J. (1957): Virus interference. I. The interferon. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 147: 258-267.

Jensen, M., Heber, U., Oettmeier, W. (1981): Chloroplast Membrane Damage During Freezing: the Lipid Phase. *Cryobiology* 18: 322-335.

Jestädt, R., Sandritter, W. (1959): Erfahrungen mit der TTC-Reaktion für die pathologisch-anatomische Diagnose des frischen Herzinfarktes. *Z Kreislaufforschung* 42: 802-809.

Karalis, K., Sano, H., Redwine, J., Litwaks, S., Wreder, R. L., Chrousos, G. P. (1991): Autocrine or paracrine inflammatory actions of corticotropin-releasing hormone in vivo. *Science* 254: 421–423.

Kariya, K., Kawauchi, R., Okamoto, H. (1981): Regional distribution of kininase in rat brain. *J. Neurochem.* 36: 2086-2088.

Kariya, K., Yamauchi, A., Hattori, S., Tsuda, Y., Okada, Y. (1982): The disappearance rate of intraventricular bradykinin in the brain of the conscious rat. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 107: 1461-1466.

Kariya, K., Yamauchi, A., Sasaki, T. (1985): Regional distribution and characterization of kinin in the CNS of the rat. *J. Neurochem.* 44: 1892-1897.

Katayama, Y., Becker, D. P., Tamura, T., Havda, D. A. (1990): Massive increases in extracellular potassium and the indiscriminate release of glutamate following concussive brain injury. *J. Neurosurg.* 73: 889-900.

Kawamata, T., Mori, T., Sato, S., Katayama, Y. (2007): Tissue hyperosmolality and brain edema in cerebral contusion. *Neurosurg. Focus* 15: 22: E5.

Kerr, J. F., Wyllie, A. H., Currie, A. R. (1972): Apoptosis: a Basic Biological Phenomenon With Wide-Ranging Implications in Tissue Kinetics. *Br. J. Cancer* 26: 239-257.

Kimelberg, H. K. (1995): Current concepts of brain edema. Review of laboratory investigations. *J. Neurosurg.* 83: 1051-1059.

Kintsurashvili, E., Duka, I., Gavras, I., Johns, C., Farmakiotis, D., Gavras, H. (2001): Effects of ANG II on bradykinin receptor gene expression in cardiomyocytes and vascular smooth muscle cells. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 281: H1778-1783.

Kirkby, N. S., Hadoke, P. W., Bagnall, A. J., Webb, D. J. (2008): The endothelin system as a therapeutic target in cardiovascular disease: great expectations or bleak house? *Br. J. Pharmacol.* 153:1105–1119.

Kitamura, N., Takagaki, Y., Furoto, S., Tanaka, T., Nawa, H., Nakanishi, S. (1983): A single gene for bovine high molecular weight and low molecular weight kininogens. *Nature* 305: 545-549.

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

Klatzo, I., Piraux, A., Laskowski, E.J. (1958). The Relationship Between Edema, Blood-Brain Barrier and Tissue Elements in a Local Brain Injury. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 17: 548-564.

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

Klein, H. H., Puschmann, S., Schaper, J., Schaper, W. (1981): The mechanism of the tetrazolium reaction in identifying experimental myocardial infarction. *Virchow's Arch. Path. Anat. Histol.* 393: 287-297.

Kleinschnitz, C., Stoll, G., Bendszus, M., Schuh, K., Pauer, H. U., Burfeind, P., Renné, C., Gailani, D., Nieswandt, B., Renné, T. (2006): Targeting coagulation factor XII provides protection from pathological thrombosis in cerebral ischemia without interfering with hemostasis. *J. Exp. Med.* 2033: 513–518.

Kleinschnitz, C., Pozgajova, M., Pham, M., Bendszus, M., Nieswandt, B., Stoll, G. (2007): Targeting platelets in acute experimental stroke: impact of glycoprotein Ib, VI, and IIb/IIIa blockade on infarct size, functional outcome, and intracranial bleeding. *Circulation* 115: 2323–2330.

Kossmann, T., Hans, V., Imhof, H. G., Stocker, R., Grob, P., Trentz, O., Morganti-Kossmann, M. C. (1995): Intrathecal and serum interleukin-6 and the acute-phase response in patients with severe traumatic brain injuries. *Shock* 4: 311–317.

Kossmann, T., Stahel, P. F., Lenzlinger, P. M. (1997): Interleukin-8 released into the human cerebrospinal fluid following traumatic brain injury is associated with blood-brain barrier dysfunction and nerve growth factor production. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 17: 280–289.

Kossmann, T., Hans, V., Stocker, R., Csuka, E., Morganti-Kossmann, M., Trentz, O. (1996a): Pro- und antiinflammatorische Zytokine im Serum und Liquor von Patienten mit schwerem Schädel-Hirn-Trauma. *Unfallchirurg* 257: 219–228.

Krieglstein, K., Unsicker, K. (1994): Transforming growth factor-beta promotes survival of midbrain dopaminergic neurons and protects them against N-methyl-4-phenylpyridinium ion toxicity. *Neuroscience* 63: 1189-1196.

Krieglstein, K., Rufer, M., Suter-Crazzolara, C., Unsicker, K. (1995a): Neural functions of the transforming growth factors beta. *Int. J. Dev. Neurosci.* 13: 301-315.

Krieglstein, K., Suter-Crazzolara, C., Fischer, W. H., Unsicker, K. (1995b): TGF-beta superfamily members promote survival of midbrain dopaminergic neurons and protect them against MPP+ toxicity. *EMBO J.* 14: 736-742.

Krieglstein, K., Unsicker, K. (1996): Distinct modulatory actions of TGF-beta and LIF on neurotrophin-mediated survival of developing sensory neurons. *Neurochem. Res.* 21: 843-850.

Krieglstein, K., Henheik, P., Farkas, L., Jaszai, J., Galter, D., Krohn, K., Unsicker, K. (1998b): Glial cell line-derived neurotrophic factor requires transforming growth factor beta for exerting its full neurotrophic potential on peripheral and CNS neurons. *J. Neurosci.* 18: 9822-9834.

Krieglstein, K. (2006): Cell death in the nervous system. *Adv. Exp. Med. Biol.* 557: 1-10.

Kuroiwa, T., Ueki, M., Chen, Q., Suemasu, H., Taniguchi, I., Okeda, R. (1994): Bio-mechanical characteristics of brain edema: The difference between vasogenic-type and cytotoxic-type edema, *Acta Neurochir. Suppl.* 60: 158-161.

Lagneux, C., Bader, M., Pesquero, J. B., Demenge, P., Ribuoit, C. (2002): Detrimental implication of B1 receptors in myocardial ischemia: evidence from pharmacological blockade and gene knockout mice. *Int. Immunopharmacol.* 2: 815– 822.

Larrivee, J. F., Bachvarov, D. R., Houle, F., Landry, J., Huot, J., Marceau, F. (1998): Role of the mitogen-activated protein kinases in the expression of the kinin B1 receptors induced by tissue injury. *J. Immunol.* 160: 1419-1426.

Law, M. M., Cryer, H. G., Abraham, E. (1994): Elevated levels of soluble ICAM-1 correlate with the development of multiple organ failure in severely injured patients. *J. Trauma* 129: 39–45.

Leeb-Lundberg, L. M., Marceau, F., Müller-Esterl, W., Pettibone, D. J., Zuraw, B. L. (2005): International union of pharmacology. XLV. Classification of the kinin receptor family: from molecular mechanisms to pathophysiological consequences. *Pharmacol. Rev.* 571: 27–77.

Liang, D., Bhatta, S., Gerzanich, V., Simard, J. M. (2007): Cytotoxic edema: mechanisms of pathological cell swelling. *Neurosurg. Focus* 22: E2.

Lindholm, D., Castren, E., Kiefer, R., Zafra, F., Thoenen, H. (1992): Transforming growth factor-beta 1 in the rat brain: increase after injury and inhibition of astrocyte proliferation. *J. Cell Biol.* 117: 395-400.

Livak, K.J., Schmittgen, T.D. (2001): Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25: 402-8.

Lo, A. C., Chen, A. Y., Hung, V. K., Yaw, L. P., Fung, M. K., Ho, M. C., Tsang, M. C., Chung, S. S., Chung, S. K. (2005): Endothelin-1 overexpression leads to further water accumulation and brain edema after middle cerebral artery occlusion via aquaporin 4 expression in astrocytic end-feet. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 25: 998 – 1011.

Lobato, R. D., Rivas, J. J., Gomez, P. A., Castaneda, M., Canizal, J. M., Sarabia, R., Cabrera, A., Munoz, M. J. (1991): Head-Injured Patients Who Talk and Deteriorate into Coma. Analysis of 211 Cases Studied With Computerized Tomography. *J. Neurosurg.* 75: 256-261.

Lynch, D. R., Dawson, T. M. (1994): Secondary Mechanisms in Neuronal Trauma. *Curr. Opin. Neurol.* 7: 510-516.

Maas, A., Dearden, M., Servadei, F., Stocchetti, N., Unterberg, A. (2000 Aug): Current recommendations for neurotrauma. *Curr. Opin. Crit. Care* 6: 281-292.

Mahabeer, R., Naidoo, S., Raidoo, D. M. (2000): Detection of tissue kallikrein and kinin B1 and B2 receptor mRNAs in human brain by in situ RT-PCR. *Metab. Brain Dis.* 15: 325-335.

Maier-Hauff, K., Baethmann, A. J., Lange, M., Schürer, L., Unterberg, A. (1984): The kallikrein-kinin system as mediator in vasogenic brain edema. Part 2: Studies on kinin formation in focal and perifocal brain tissue. *J. Neurosurg.* 61: 97-106.

Marceau, F., Hess, J. F., Bachvarov, D. B. (1998): The B1 receptors for kinins. *Pharmacol. Rev.* 50: 357-386.

Marmarou, A. (1994): Traumatic brain edema: an overview, *Acta Neurochir. Suppl.* 60: 421-424.

Matsuo, Y., Mihara, S., Ninomiya, M., Fujimoto, M. (2001): Protective effect of endothelin type A receptor antagonist on brain edema and injury after transient middle cerebral artery occlusion in rats. *Stroke* 32: 2143–2148.

Mauter, A., Fukuda, K., Noble, L. J. (1996a): Cellular response in the cerebellum after midline traumatic brain injury in the rat. *Neurosci. Lett.* 214: 95–98.

Mauter, A., Fukuda, K., Noble, L. J. (1996b): Cerebellar immune response following traumatic brain injury in the rat. A hypothesis. In *Brain protection in severe head injury*. (eds. Diemath, H. E., Sommerauer, J. von Wild, K. R. H.) S.103-106. Zuckschwerdt-Verlag, München-Bern-Wien-New York.

Mazue, G., Bertolero, F., Garofano, L., Brughera, M., Carminati, P. (1992): Experience with the preclinical assessment of basic fibroblast growth factor (bFGF). *Toxicol. Lett.* 64: 329–338.

McClain, C. J., Cohen. D., Philipps, R, Ott, L., Young, B. (1991): Increased plasma and ventricular fluid interleukin-6 levels in patients with head injury. *J. Lab. Clin. Med.* 118: 225–231.

Mchedlishvili, G. (1986): Role of cerebral microcirculation in secondary brain damage. In *Mechanisms of Secondary Brain Damage* (Baethmann, A., Go, K.G., Unterberg, A. eds.) S. 295-302. Plenum Press, New York, London.

McLean, P. G., Ahluwalia, A., Perretti, M. (2000): Association between kinin B(1)receptor expression and leukocyte trafficking across mouse mesenteric post-capillary venules. *J. Exp. Med.* 192: 367–380.

Medeiros, R., Cabrini, D. A., Ferreira, J., Fernandes, E. S., Mori, M. A., Pesquero, J. B., Bader, M., Avellar, M. C., Campos, M. M. (2004): Calixto JB. Bradykinin B1 receptor expression induced by tissue damage in the rat portal vein: a critical role for mitogen-activated protein kinase and nuclear factor-kappaB signaling pathways. *Circ. Res.* 94: 1375–1382.

Memezawa, H., Minamisawa, H., Smith, M. L., Siesjo, B. K. (1992): Ischemic Penumbra in a Model of Reversible Middle Cerebral Artery Occlusion in the Rat. *Exp. Brain Res.* 89: 67-78.

Mendelow, A. D., Teasdale, G. M. (1983): Pathophysiology of head injuries. *Br. J. Surg.* 70: 641-650.

Meryman, H. T. (1956): Mechanisms of Freezing in Living Cells and Tissue. *Science* 124: 515-515.

Moldes, O., Sobrino, T., Millán, M., Castellanos, M., de la Ossa, N. P., Leira, R., Serena, J., Vivancos, J., Dávalos, A., Castillo, J. (2008): High Serum Levels of Endothelin-1 Predict Severe Cerebral Edema in Patients With Acute Ischemic Stroke Treated With t-PA. *Stroke* 39: 2006-2010.

Morganti-Kossmann, M. C., Kossmann, T., Brandes, M. E., Mergenhagen, S. E., Wahl, S. M. (1992): Autocrine and paracrine regulation of astrocyte function by transforming growth factor-beta. *J. Neuroimmunol.* 39: 163-173.

Morganti-Kossmann, M. C., Kossmann, T. (1997): The immunology of brain injury. In: Rothwell NJ (eds.) *Immune responses in the nervous system.* S. 159–187. BIOS, Manchester:

Mokri, B. (2001): The Monro-Kellie hypothesis: applications in CSF volume depletion. *Neurology* 56: 1746-1748.

Mumenthaler, M., Mattle, H. (2001): *Neurologie.* 11, 80. Georg Thieme Verlag. Stuttgart.

Murray, G. D., Teasdale, G. M., Braakman, R., Cohadon, F., Dearden, M., Iannotti, F., Karimi, A., Lapierre, F., Maas, A., Ohman, J., Persson, L., Servadei, F., Stocchetti, N., Trojanowski, T., Unterberg, A. (1999): *Acta Neurochir.* 141: 223-236.

Nagy, Z., Pappius, H. M., Mathieson, G., Huttner, I. (1979): Opening of Tight Junctions in Cerebral Endothelium. I. Effect of Hyperosmolar Mannitol Infused Through the Internal Carotid Artery. *J. Comp. Neurol.* 185: 569-578.

Naitoh, Y., Fukata, J., Tominaga, T., Nakai, Y., Tamei, S., Mori, K., Inura, H. (1988): IL-6 stimulates the secretion of adrenocortitropic hormone in conscious, freely-moving, rats. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 155: 1459–1463.

Neff, S., Subramaniam, R. P. (1996): Monro-Kellie doctrine. *J. Neurosurg.* 85: 1195.

Ni, A., Chao, L., Chao, J. (1998b): Transcription factor nuclear factor kappa B regulates the inducible expression of the human B1 receptor gene in inflammation. *J. Biol. Chem.* 273: 2784-2791.

Ni, A., Chai, K. X., Chao, L., Chao, J. (1998a): Molecular cloning and expression of rat bradykinin B1 receptor. *Biochim. Biophys. Acta.* 1442: 177-185.

Orawski, A. T., Simmons, W. H. (1989): Degradation of bradykinin and its metabolites by rat brain synaptic membranes. *Peptides*10: 1063-1073.

Ott, L., McClain, C. J., Gillespie, M., Young, B. (1994): Cytokines and metabolic dysfunction after severe head injury. *J. Neurotrauma* 11:447–471.

Pan, Z. K., Zuraw, B. L., Lung, C. C. (1996): Bradykinin stimulates NF kappa B activation and Interleukin-1 beta gene expression. *J. Clin. Invest.* 98: 2042-2049.

Park, C. H., Choi, S. H., Piao, Y., Kim, S., Lee, Y. J., Kim, H. S., Jeong, S. J., Rah, J. C., Seo, J. H., Lee, J. H., Chang, K., Jung, Y. J., Suh, Y. H. (2000): Glutamate and aspartate impair memory retention and damage hypothalamic neurons in adult mice. *Toxicol. Lett.* 115: 117-125.

Partrick, S. A., Moore, F. A., Moore, E. E., Biffl, W. L., Sauaia, A., Barnett, C. C. (1996): The inflammatory profile of interleukin-6, interleukin-8, and soluble intercellular adhesion molecule-1 in postinjury multiple organ failure. *Am. J. Surg.* 172: 425–431.

Pearson, E. S., Stephens, M. A. (1964): The ratio of range to standard deviation in the same normal sample. *Biometrika* 51: 484-487.

Peptide growth factors and their receptors, *Handbook of Experimental Pharmacology* (1990): Vol. 95. S. 419-475. Springer Verlag, Heidelberg.

Perry, D. C., Snyder, S. H. (1984): Identification of bradykinin in mammalian brain. *J. Neurochem.* 43: 1072-1080.

Pesquero, J. B., Araujo, R. C., Heppenstall, P. A., Stucky, C. L., Silva, J. A. Jr, Walther, T., Oliveira, S. M., Pesquero, J. L., Paiva, A. C., Calixto, J. B., Lewin, G. R., Bader, M. (2000): Hypoalgesia and altered inflammatory responses in mice lacking kinin B1 receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97: 8140–8145.

Phagoo, S. B., Poole, S., Leeb-Lundberg, L. M. (1999): Autoregulation of bradykinin receptors: agonists in the presence of interleukin-1beta shift the repertoire of receptor subtypes from B2 to B1 in human lung fibroblasts. *Mol. Pharmacol.* 56: 325-333.

Phillis, J. W., O'Regan, M. H. (2004): A potentially critical role of phospholipases in central nervous system ischemic, traumatic, and neurodegenerative disorders. *Brain Res. Rev.* 44: 13-47.

Piek, J., Chesnut, R. M., Marshall, L. F. (1992): Extracranial complications of severe head injury. *J. Neurosurg.* 77: 901-907.

Pizard, A., Marchetti, J., Allegrini, J., Alhenc-Gelas, F., Rajerison, R. M. (1998): Negative cooperativity in the human B2 receptor. *J. Biol. Chem.* 273: 1309–1315.

Povlishock, J. T. (2000): Pathophysiology of neuronal injury: therapeutic opportunities and challenges. *Clin. Neurosurg.* 46: 113-126.

Povlishock, J. T., Jenkins, L. W. (1995): Are the pathological changes evoked by traumatic brain injury immediate and irreversible? *Brain Pathol.* 5: 415-426.

Povlishock, J. T., Christman, C. W. (1995): The pathobiology of traumatically induced axonal injury in animals and humans– a review of current thoughts. *J. Neurotrauma* 12: 555-564.

Povlishock, J. T. (1992): Traumatically induced axonal injury: pathology and pathobiological implications. *Brain Pathol.* 2: 1-12.

Proud, D., Mc Glashan, D. W. J., Newball, H. H., Schulmann, E. S., Lichtenstein, L. M. (1985): Immunoglobulin E-mediated release of a kininogenase from purified human lung mast cells. *Am. Rev. Resp. Dis.* 132: 405-408.

Quintaò, N. L., Passos, G. F., Medeiros, R., Paszcuk, A. F., Motta, F. L., Pesquero, J. B., Campos, M. M., Calixto, J. B. (2008): Neuropathic pain-like behavior after brachial plexus avulsion in mice: the relevance of kinin B1 and B2 receptors. *J. Neurosci.* 28: 2856-2863.

Rahman, M. M., McFadden, G. (2006): Modulation of Tumor Necrosis Factor by Microbial Pathogens. *PLoS Pathog.* 2: e4.

Raidoo, D. M., Bhoola, K. D. (1997): Kinin receptors on human neurones. *J. Neuroimmunol.* 77: 39-44.

Raidoo, D. M., Ramchurren, N., Naidoo, Y., Naidoo, S., Muller-Esterl, W., Bhoola, K. D. (1996): Visualisation of bradykinin B2 receptors on human brain neurons. *Immunopharmacology* 33: 104-107.

Rapaport, S. I., Robinson, P. J. (1986): Tight-Junctional Modification As the Basis of Osmotic Opening of the Blood-Brain Barrier. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 481: 250-267.

Raslan, F., Schwarz, T., Meuth, S. G., Austinat, M., Bader, M., Renne´, T., Roosen, K., Stoll, G., Sirén, A. L., Kleinschnitz, C. (2010): Inhibition of bradykinin receptor B1 protects mice from focal brain injury by reducing blood–brain barrier leakage and inflammation. *J. Cereb. Blood Flow & Metab.* 30:1477-1486.

Regoli, D., Barabe, J. (1980): Pharmacology of bradykinin and related kinins. *Pharmacol. Rev.* 32: 1-46.

Rich, J. N., Zhang, M., Datto, M. B., Bigner, D. D., Wang, X. F. (1999): Transforming growth factor-beta-mediated p15 (INK4B) induction and growth inhibition in astrocytes is SMAD3-dependent and a pathway prominently altered in human glioma cell lines. *J. Biol. Chem.* 274: 35053-35058.

Rickels, E., Von Wild, K., Wenzlaff, P., Bock, W. J. (Hrsg) (2006). Schädel-Hirn-Verletzung. Epidemiologie und Versorgung. Ergebnisse einer prospektiven Studie. 258 Seiten. Zuckschwerdt – Verlag, München-Wien-New York.

Rink, A., Fung, K. N., Trojanowski, J. W., Lee, V., Neugebauer, E., McIntosh, T. K. (1995): Evidence of apoptotic cell death after experimental traumatic brain injury in the rat. *Am. J. Pathol.* 147: 1575–1583.

Rocha e Silva, M., Beraldo, W. T., Rosenfeld, G. (1949): Bradykinin hypotensive and smooth muscle stimulating factor released from plasma globulins by snake venoms and trypsin. *Am. J. Physiol.* 156: 261-265.

Rosenberg, G. A., Yang, Y. (2007): Vasogenic edema due to tight junction disruption by matrix metalloproteinases in cerebral ischemia. *Neurosurg. Focus* 15; 22:E4.

Rosenblum, W. I. (1986): Endothelium- dependent relaxation demonstrated in vivo in cerebral arterioles. *Stroke* 17: 494-497.

Sarker, M. H., Hu, D. E., Fraser, P. A. (2000): Acute effects of bradykinin on cerebral microvascular permeability in the anaesthetized rat. *J. Physiol.* 528: 177–187.

Schachter & Thain (1954): Chemical and pharmacological properties of the potent, slow contracting substance (kinin) in wasp venom. *Br. J. Pharmacol. Chemother.* 9: 352-359.

Schanstra, J. P., Bataille, E., Marin Castano, M. E., Barascud, Y., Hirtz, C., Pesquero, J. B., Pecher, C., Gauthier, F., Girolami, J. P., Bascands, J. L. (1998): The B1-agonist [desArg10]-kallidin activates transcription factor NF-kappa B and induces homologous upregulation of the bradykinin B1-receptor in cultured human lung fibroblasts. *J. Clin. Invest.* 101: 2080-2091.

Scicli, A. G., Forbes, G., Nolly, H., Dujovny, M., Carretero, O. A. (1984): Kallikrein-kinins in the central nervous system. *Clin. Exp. Hypertens. A.* 6: 1731-1738.

Shi, B., Mahesh, V. B., Bhat, G. K., Ping, L., Brann, D. W. (1998): Evidence for a role of bradykinin neurons in the control of gonadotropin-releasing hormone secretion. *Neuroendocrinology* 67: 209-218.

Shisheva, A., Printz, M. P., Paul, M., Ganten, D. (1983): Evidence for kinin forming activity in rat brain. *Fed. Proc.* 43: 1021.

Simmons, D. L., Botting, R. M., Hla, T. (2004): Cyclooxygenase Isozymes: The Biology of Prostaglandin Synthesis and Inhibition. *Pharmacol. Rev.* 56: 387-437.

Sirén, A.-L., Radyushkin, K., Boretius, S., Kämmer, D., Riechers, C.-C., Natt, O., Sargin, D., Watanabe, T., Sperling, S., Michaelis, T., Price, J., Maier, B., Frahm, J., Ehrenreich, H. (2006): Global brain atrophy after unilateral parietal lesion and its prevention by erythropoietin. *Brain* 129: 480-489.

Sousa, V. O., Romao, L., Neto, V. M., Gomes, F. C. (2004): Glial fibrillary acidic protein gene promoter is differently modulated by transforming growth factor-beta 1 in astrocytes from distinct brain regions. *Eur. J. Neurosci.* 19: 1721-1730.

Souza, D. G., Lomez, E. S., Pinho, V., Pesquero, J. B., Bader, M., Pesquero, J. L., Teixeira, M. M. (2004): Role of bradykinin B2 and B1 receptors in the local, remote, and systemic inflammatory responses that follow intestinal ischemia and reperfusion injury. *J. Immunol.* 172: 2542–2548.

Statham, P.F., Johnston, R. A., Macpherson, P. (1989): Delayed Deterioration in Patients with Traumatic Frontal Contusions. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 52: 351-354.

Stern, W. E. (1963): Intracranial fluid dynamics, the relationship of intracranial pressure to the Monroe-Kellie-Doctrine and the reliability of pressure assessment. *J.R.Coll.Surg. Edinb.* 168: 18-36.

Suzumura, A., Sawada, M., Yamamoto, H., Marunouchi, T. (1993): Transforming growth factor-beta suppresses activation and proliferation of microglia in vitro. *J.Immunol.* 151: 2150-2158.

Swanson, R. A., Morton, M.T., Tsao-Wu, G., Savalos, R. A., Davidson, C., Sharp, F. R. (1990): A semiautomated method for measuring brain infarct volume. *J Cereb Blood Flow Metab.*10: 290–293.

Takahashi, H., Manaka, S., Sano, K. (1981): Changes in extracellular potassium concentration in cortex and brain stem during the acute phase of closed head injury. *J. Neurosurg.* 55: 708-717.

Teasdale, G. M., Graham, D. I. (1998): Craniocerebral trauma: protection and retrieval of the neuronal population after injury. *Neurosurg.* 43:723–737.

Toda, N. (1977): Actions of bradykinin on isolated cerebral and peripheral arteries. *Am. J. Physiol.* 232: H267- H276.

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

Unterberg, A., Hack, U., Baethmann, A. (1985): Blood flow metabolism and function of the brain during cerebral administration of bradykinin. In: *Adv. Neurosurg.* Vol 13 (Dietz, H., Brock, M., Klinger, M. eds.) S. 326- 329. Springer, Berlin.

Unterberg, A., Wahl, M., Baethmann, A. (1984): Effects of bradykinin on permeability and diameter of pial vessels in vivo. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 4: 574-585.

Unterberg, A., Baethmann, A., Hack, U. (1983): Cerebral blood flow and metabolism during bradykinin exposure. In: *Cereb Blood Flow Metab. and Epilepsie.* (Baldy-Moulinier, M., Ingvar, D. H., Meldrum, B. S. eds.) S. 174-179. John Libbey, London.

Unterberg, A. W., Stroop, R., Thomale, U. W., Kiening, K. L., Päuser, S., Vollmann, W. (1997): Characterisation of brain edema following "controlled cortical impact injury" in rats. *Acta Neurochir. Suppl.* 70: 106-108.

Vanhoutte, P. M. (1989): Endothelium and control of vascular function. *State of the Artlecture. Hypertension* 13: 658-667.

Vergeli, M., Mazzanti, B., Ballerini, C., Gran, B., Amaducci, L., Massacesi, L. (1995): Transforming growth factor-beta 1 inhibits the proliferation of rat astrocytes induced by serum and growth factors. *J. Neurosci. Res.* 40: 127-133.

Vorbrodt, A. W., Lossinsky, A. S., Wisniewski, H. M., Suzuki, R., Yamaguchi, T., Ma-saoka, H., Klatzo, I. (1985): Ultrastructural observations on the transvascular route of protein removal in vasogenic brain edema. *Acta Neuropathol.* 66: 265-273.

Wachtvogel, Y. T., Cadena de la, R. A. (1993): Structural biology, cellular interactions and pathophysiology of the contact system. *Thromb. Res.* 72: 1-21.

Wahl, M., Young, A. R., Edvinsson, L., Wagner, F. (1983b): Effects of kininase II inhibitors on the vasomotor response to bradykinin on feline intracranial and extracranial arteries in vitro and in situ. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 3: 339-345.

Werle, E., Berek, U. (1948): Zur Kenntnis des Kallikreins. *Angew. Chem.* 60A: 53-57.

Werle, E., Grunz, M. (1939): Zur Kenntnis der darmkontrahierenden, uteruserregenden und blutdrucksenkenden Substanz. *Biochem. Z.* 301: 429-436.

Werle, E., Götze, W., Keppler, A. (1937): Über die Wirkung des Kallikreins auf den isolierten Darm und über eine neue darmkontrahierende Substanz. *Biochem. Z.* 289: 217-233.

Whalley, E. T., Wahl, M. (1983a): Analysis of bradykinin receptor mediating relaxation of cat cerebral arteries in vivo and in vitro. *Naunyn-Schmiedberg's Arch. Pharmacol.* 323: 66-71.

Whalley, E. T., Amure, Y. O., Lye, R. H. (1987a): Analysis of the mechanism of action of bradykinin on human basilar artery in vitro. *Naunyn-Schmiedberg's Arch. Pharmacol.* 335: 433-437.

Whalley, E. T., Nwator, I., Stewart, J. M., Varek, R. J. (1987b): Analysis of the receptor mediating vascular actions of bradykinin. *Naunyn-Schmiedberg's Arch. Pharmacol.* 336: 430-433.

Wirth, K., Hock, F. J., Albus, U., Linz, W., Alpermann, H. G., Anagnostopoulos, H., Henk, S., Breipohl, G., König, W., Knolle, J. (1991): Hoe 140 a new potent and long acting bradykinin-antagonist in vivo studies. *Br. J. Pharmacol.* 102: 774 –777.

Wolman, M., Klatzo, I., Chui, E., Wilmes, F., Nishimoto, K., Fujiwara, K., Spatz, M. (1981): Evaluation of the dye-protein tracers in pathophysiology of the blood-brain barrier. *Acta Neuropathol.* 54: 55-61.

Woodroffe, M. N. (1995): Cytokine production in the central nervous system. *Neurology* 45: 6–10.

Xu, J., Hsu, C. Y., Junker, H., Chao, S., Hogan, E. L., Chao, J. (1991): Kininogen and kinin in experimental spinal cord injury. *J. Neurochem.* 57: 975-980.

Xu, J., Carretero, O. A., Sun, Y., Shesely, E. G., Rhaleb, N. E., Liu, Y. H., Liao, T. D., Yang, J. J., Bader, M., Yang, X. P. (2005): Role of the B1 kinin receptor in the regulation of cardiac function and remodeling after myocardial infarction. *Hypertension* 45: 747–753.

Yan, H. Q., Banos, M. A., Merregodts, P., Hooghe, R., Hooghe-Peters, E. L. (1992): Expression of interleukin (IL)-1b, IL-6 and their respective receptors in the normal rat brain and after injury. *Eur. J. Immunol.* 22: 2963–2971.

Yin, H., Chao, J., Bader, M., Chao, L. (2007): Differential role of kinin B1 and B2 receptors in ischemia-induced apoptosis and ventricular remodeling. *Peptides* 28: 1383–1389.

Zausinger, S., Lumenta, D. B., Pruneau, D., Schmid-Elsaesser, R., Plesnila, N., Baethmann, A. (2002): 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.* 950: 268-278.