

**Aus der Klinik für Anästhesiologie
Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Prof. Dr. Bernhard Zwißler**

**Identifizierung und Charakterisierung zerebrovaskulärer
Veränderungen nach Schädel-Hirn Trauma
und ihre Bedeutung für die Entwicklung
neuer Therapien**



Kumulative Habilitationsschrift
vorgelegt von
Dr. med. Susanne Monika Schwarzmaier

2023

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung.....	3
2.	Material und Methoden	5
3.	Charakterisierung der Veränderungen in der zerebralen Mikrozirkulation nach SHT.....	9
3.1.	Mechanismen der Minderperfusion in der Penumbra nach SHT.....	9
3.2.	Mechanismen und Effekt der arteriellen Vasodilatation nach Trauma	10
3.3.	Bildung von Mikrothromben nach SHT.....	11
3.4.	Einfluss von Leukozyten auf die sekundäre Nekrose-Ausbreitung nach SHT.....	12
3.5.	Diskussion und Bedeutung für das wissenschaftliche Feld.....	13
3.6.	Limitationen.....	16
4.	Charakterisierung des vasogenen Hirnödems nach SHT.....	17
4.1.	Identifizierung der vaskulären Quelle.....	18
4.2.	Zeitlicher Verlauf.....	19
4.3.	Diskussion und Bedeutung für das wissenschaftliche Feld.....	20
4.4.	Limitationen.....	20
5.	Aktueller Stand und Ausblick.....	21
6.	Danksagung	22
7.	Publikationsverzeichnis	23
8.	Literaturverzeichnis.....	25
9.	Anlagen – Publikationen der kumulativen Habilitationsleistung	29

Der überwiegende Teil der Arbeiten der Antragstellerin hat sich mit zerebrovaskulären Veränderungen nach experimentellem Hirnschaden und den zugrundeliegenden Mechanismen befasst, so dass die schriftliche Habilitationsleistung als kumulative Habilitationsschrift erbracht wird.

1. Einleitung

Das Schädel-Hirn Trauma (SHT) ist ein weit verbreitetes und sehr heterogenes Krankheitsbild. Es reicht von der einfachen Commotio bis zur schweren Contusio, mit oder ohne knöcherne Verletzung oder intrazerebrale Blutung (Maas, Stocchetti, and Bullock 2008). Es gibt viele verschiedene Auslöser wie einen Sturz, einen Schlag auf den Kopf (beispielsweise auch beim Sport) oder ein Schleudertrauma. Ein SHT ist mit hoher Letalität und Morbidität vergesellschaftet und weiterhin weltweit der häufigste Grund für eine lebenslange Behinderung von Kindern und jungen Erwachsenen (Maas, Stocchetti, and Bullock 2008; Peeters et al. 2015). Dies liegt vor allem daran, dass bisher keine kausale Therapie verfügbar ist. Die aktuellen Behandlungsoptionen reduzieren sich auf symptomatische Therapieansätze (Grande and Romner 2012; Jha, Kochanek, and Simard 2019; Marklund et al. 2019).

Der initiale Schaden, welcher durch die akute mechanische Krafteinwirkung verursacht wird, der sogenannte Primärschaden, entsteht unmittelbar während des Traumas und ist irreversibel. Durch das initiale Ereignis und den Primärschaden werden im weiteren Verlauf eine Vielzahl von Mechanismen in Gang gesetzt, die sowohl auf zellulärer wie auch auf subzellulärer Ebene zu weiteren Veränderungen führen (Sahuquillo, Poca, and Amoros 2001; Jha, Kochanek, and Simard 2019; Plesnila 2016). Die pathophysiologischen Prozesse können sich in Abhängigkeit vom jeweiligen Schadensmechanismus im Detail unterscheiden. So führt beispielsweise ein Schleudertrauma vor allem zu einem diffusen Axonschaden, während eine Kontusion hauptsächlich eine lokalisierte Zerstörung von Gewebe verursacht (Sahuquillo, Poca, and Amoros 2001; Jha, Kochanek, and Simard 2019). Dennoch gibt es einige grundsätzliche gemeinsame Mechanismen, welche die Pathophysiologie nach SHT wesentlich beeinflussen. So kommt es unter anderem zu einer Schwellung im Bereich des geschädigten Gewebes, welche aufgrund des durch den Schädel begrenzten Raumes letztendlich zu einem Anstieg des intrakraniellen Druckes (ICP) und somit zu Verminderung der zerebralen Perfusion führt. Hieraus folgt eine Unterversorgung des Parenchyms mit Sauerstoff, und zwar auch in Bereichen des Gehirns, die primär nicht geschädigt wurden. Diese Minderperfusion führt zum Absterben weiterer Zellen und somit zu einer Vergrößerung des ursprünglichen Gewebeschadens (Jha, Kochanek, and Simard 2019; Sahuquillo, Poca, and Amoros 2001). Je nach Schadensmechanismus kann sich der verzögerte Zellschaden diffus oder lokal ausbreiten. Bei Kontusionen ist vor allem die unmittelbare Umgebung des Primärschadens, die sogenannte Penumbra, betroffen (Bramlett and Dietrich 2004; Sahuquillo, Poca, and Amoros 2001; Plesnila 2007). Dieser zusätzliche Gewebeschaden wird als sekundärer Hirnschaden

bezeichnet. Durch die zeitliche Verzögerung von Stunden bis Tagen nach dem Initialschaden ist der sekundäre Hirnschaden prinzipiell durch Therapien beeinflussbar.

Hierbei kann zwischen zwei Begriffen unterschieden werden: Zum einen gibt es die sekundäre Nekrose-Ausbreitung, welche in histologischen Proben gemessen wird. Dieser histologisch messbare Schaden erreicht in dem für die hier vorliegenden Studien verwendeten Modell (Controlled Cortical Impact, CCI) nach 24 bis 48 Stunden sein Maximum (Zweckberger et al. 2006; Kochanek et al. 1995; Fournier et al. 2021). Das zerebrale Gewebe, welches sekundär nekrotisch wird, liegt in der traumatischen Penumbra. Das Ausmaß des Gewebeschadens korreliert hierbei mit funktionellen Defiziten. Zum anderen spricht man von sekundärem Hirnschaden, wenn explizit auch neurologische und funktionelle Aspekte im langfristigen Verlauf berücksichtigt werden. Dieser sekundäre Hirnschaden entwickelt sich deutlich prolongiert (Tage bis Monate nach Trauma), hat jedoch häufig kein greifbares histomorphologisches Korrelat. Der sekundäre Hirnschaden ist komplexer zu erfassen als die reine sekundäre Nekrose-Ausbreitung (Hall et al. 2008; Maas, Stocchetti, and Bullock 2008; Mao et al. 2020). Eine andere Einteilung unterscheidet entsprechend zwischen einem akuten (innerhalb 24-48 Stunden entstehend) und einen chronischen Hirnschaden (Sahuquillo, Poca, and Amoros 2001).

Für die Entwicklung neuer Therapieansätze ist eine genaue Charakterisierung der Pathomechanismen nach SHT auf physiologischer, zellulärer und molekularer Ebene sowie deren Bedeutung für die Entwicklung eines akuten und chronischen Hirnschadens erforderlich (Sahuquillo, Poca, and Amoros 2001; Maas et al. 1999; Jha, Kochanek, and Simard 2019; Plesnila 2016). Ebenso hat der zeitliche Verlauf der pathophysiologischen Prozesse eine zentrale Bedeutung, da dieser den Rahmen für therapeutische Interventionen, das therapeutische Fenster, determiniert.

Eine Vielzahl der Pathomechanismen des SHT konnten tierexperimentell untersucht werden (Morganti-Kossmann, Yan, and Bye 2010; Sahuquillo, Poca, and Amoros 2001). Allerdings waren die Untersuchungen oft technisch limitiert (Jha, Kochanek, and Simard 2019; Sahuquillo, Poca, and Amoros 2001; Bruce et al. 2015). Sie beschränkten sich häufig auf einzelne Zeitpunkte, an denen das Gehirn entnommen und mittels histologischer Methoden untersucht wurde. Dazu kamen funktionelle Untersuchungen mit neurologischen Tests (Morganti-Kossmann, Yan, and Bye 2010). Untersuchungen am lebenden Gehirn waren lange Zeit nur bei größeren Tieren wie Kaninchen möglich. Bei diesen war allerdings die Verfügbarkeit von genetisch veränderten Tieren im Gegensatz zu kleineren Spezies, insbesondere im Vergleich zu Mäusen, nicht vorhanden. Auch an Mäusen wurden in vivo Untersuchungen durchgeführt, jedoch meist nicht unter adäquater Narkoseführung (beispielsweise ohne kontrollierte Beatmung). Zudem wurden wichtige physiologischen Parameter wie Temperatur, Blutdruck oder Blutgase nicht erfasst oder kontrolliert (Schwarzmaier and Plesnila 2014). Eine direkte Untersuchung der Pathomechanismen nach SHT in vivo, in (transgenen) Mäusen, und zwar unter

physiologischen Bedingungen und über einen längeren Zeitraum, war lange Zeit aufgrund von technischen Einschränkungen nicht möglich (Bruce et al. 2015; Jha, Kochanek, and Simard 2019; Thal and Plesnila 2007).

Aufgrund der oben geschilderten Limitationen wurde von der Antragstellerin zunächst ein Modell etabliert, welches eine in vivo Untersuchung der zerebralen Mikrozirkulation bei Mäusen mit einem klinisch relevanten experimentellen SHT-Modell kombiniert. Das Trauma wurde mit dem Controlled Cortical Impact Modell (CCI) appliziert (Dixon et al. 1991; Lighthall, Dixon, and Anderson 1989; Fournier et al. 2021). Dieses verursacht eine standardisierte Kontusion mit sehr gut reproduzierbarer sekundärer Nekrose-Ausbreitung bzw. sekundärem Hirnschaden (Kochanek et al. 1995; Zweckberger et al. 2006). Es wurde ein Narkoseprotokoll verwendet, welches eine kontrollierte Beatmung sowie eine kontinuierliche Überwachung wesentlicher physiologischer Parameter wie Temperatur, end-tidalem pCO₂, und mittlerem arteriellem Blutdruck erlaubt (Thal and Plesnila 2007). Nur die Versuche, in denen die Parameter innerhalb des physiologischen Toleranzbereichs blieben, wurden für die Auswertung verwendet.

2. Material und Methoden

Tiere

In jeder Studie wurden männliche C57Bl6 Mäuse, n=6-10/Gruppe verwendet. Falls transgene Mäuse oder Knockout-Mäuse verwendet wurden, ist dies bei den einzelnen Studien angegeben.

Trauma

Das Trauma wurde mittels Controlled Cortical Impact (CCI) appliziert. Hierbei wird zunächst über dem rechten parietalen Kortex eine Trepanation durchgeführt und der Knochen entfernt. Anschließend wird über einen pneumatisch angetriebenen Stempel eine standardisierte Kontusion appliziert. Das Ausmaß der Kontusion wird durch Stempeldurchmesser, Eindringtiefe und Eindringgeschwindigkeit bestimmt. Unmittelbar nach Applikation des Traumas wird die Trepanation wieder mit dem vorher entnommenen Knochendeckel verschlossen. Das Modell verursacht einen standardisierten mechanischen Schaden, sowie eine gut reproduzierbare sekundäre Nekrose-Ausbreitung bzw. sekundären Hirnschaden (Lighthall, Dixon, and Anderson 1989; Kochanek et al. 1995; Zweckberger et al. 2006; Bryan, Cherian, and Robertson 1995).

Narkose und Monitoring

Für kurze Eingriffe (kürzer als 45 min, beispielsweise für die Applikation des Traumas) wurden die Tiere mit Isofluran per inhalationem in einem Gemisch aus 35% O₂ und 65% N₂O sowie Buprenorphin s.c. analgosediert.

Die Intravitalmikroskopie inklusive der operativen Vorbereitung wurde in Intubationsnarkose durchgeführt. Die Tiere wurden mittels Medetomidin, Midazolam, und Fentanyl narkotisiert, endotracheal intubiert, volumenkontrolliert beatmet und physiologisch überwacht, d.h. es erfolgte eine kontinuierliche Überwachung von Temperatur, end-tidalem pCO₂, mittlerem arteriellen Blutdruck (invasiv via A. femoralis) sowie eine Bestimmung von Blutgasen und Elektrolyten am Ende des Versuchs.

Intravitalmikroskopie

Die Untersuchungen wurden anfangs mit einem Auflicht-Fluoreszenzmikroskop durchgeführt, später mittels 2-Photonenmikroskopie (siehe unten).

Für die Beobachtung der Mikrozirkulation wurde ein kraniales Fenster präpariert. Dieses wurde unmittelbar frontal zur primären Kontusion platziert (Abbildung 1). Das ermöglichte eine Beobachtung von gesundem Gewebe sowie von Gewebe innerhalb der traumatischen Penumbra, das heißt in dem Bereich, der innerhalb von 24 Stunden nekrotisch wird.

Zunächst wurden die pialen Gefäße, das heißt die Gefäße an der Oberfläche des Gehirns, durch ein „offenes“ kraniales Fenster mittels Fluoreszenzmikroskopie beobachtet (Schwarzmaier et al. 2010; Schwarzmaier et al. 2015; Schwarzmaier et al. 2013). Es wurden Veränderungen der Gefäßdurchmesser sowie die Reaktionen von Thrombozyten und Leukozyten beobachtet. Als Fluoreszenzmarker wurden FITC Dextran für Plasma und Rhodamin 6G für Leukozyten und Thrombozyten verwendet, welche über die Femoralvene injiziert wurden. Ein Austrocknen des Fensters wurde durch die Applikation von NaCl 0,9% verhindert.

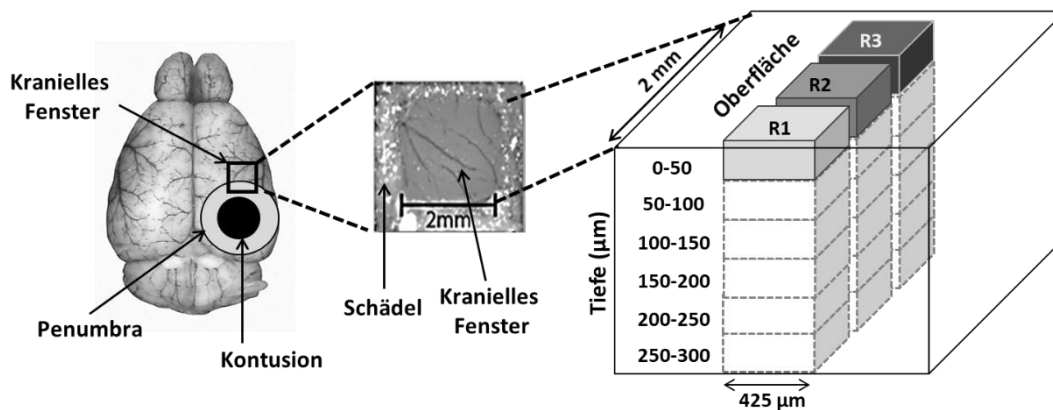


Abbildung 1: Lokalisation des untersuchten Bereichs. Darstellung der Lokalisation von Kontusion (schwarz), Penumbra (grau) und kranielem Fenster auf dem Gehirn einer Maus. Die Lage des kranielem Fensters war für die oberflächlichen Untersuchungen sowie für die Untersuchungen mittels 2PM identisch. Es wurden immer drei Regionen von proximal nach distal zur Kontusion untersucht (R1-R3). Mit 2PM wurden zudem Veränderungen im Parenchym bis 300 µm Tiefe beobachtet.

In den Untersuchungen, welche Veränderungen innerhalb der ersten 120 Minuten nach Trauma beschreiben, wurde vor Applikation des Traumas die Mikrozirkulation im gesunden Gewebe (Ausgangsbedingungen/Baseline) gemessen. Für Untersuchungen zu einem späteren Zeitpunkt nach Trauma wurde das Protokoll adaptiert: Die Tiere erhielten für die Indiktion des SHT eine Kurznarkose (Lachgas oder Frischluft mit jeweils 33% Sauerstoff und Isofluran 1,5-2% per Inhalationem sowie Buprenorphin s.c.) und wurden zu einem späteren Zeitpunkt für die intravitalmikroskopische Untersuchung wie oben beschrieben vorbereitet (Abbildung 2).

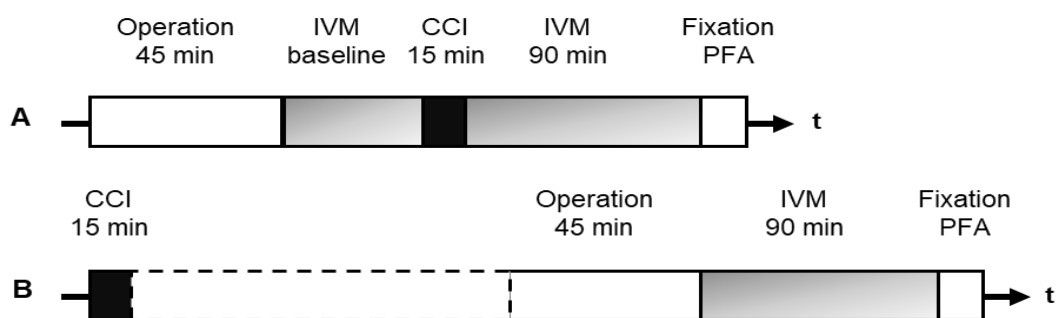


Abbildung 2: Beispiele für Versuchsprotokolle. A: Nach der operativen Vorbereitung wurden zunächst die Ausgangsbedingungen (Baseline) gemessen. Anschließend wurde das Trauma appliziert und die Mikrozirkulation für weitere 90-120 Minuten beobachtet. B: Für Untersuchungen zu einem späteren Zeitpunkt wurde das Trauma in Kurznarkose appliziert und die Tiere erholten sich anschließend in einer temperierten „Recovery Chamber“ von der Narkose. Intubation, Operation und Intravitalmikroskopie erfolgten zu späteren Zeitpunkten (Schwarzmaier et al. 2013).

Um die pathophysiologischen Prozesse nach SHT abbilden zu können, ist eine Untersuchung der oberflächlichen Gefäße jedoch nicht ausreichend. Deshalb wurde das Untersuchungsmodell weiterentwickelt und um die Technik der 2-Photonenmikroskopie ergänzt (s. unten). Somit war nun eine Untersuchung des Parenchyms, indem sich der Schaden tatsächlich entwickelt, in drei Dimensionen und mit hoher Auflösung möglich. Hierfür wurde den Tieren ein geschlossenes kraniales Fenster implantiert: nach Präparation des Fensters (Trepanation) wurde die Dura mater vorsichtig entfernt und ein Glasplättchen wurde in die Trepanation implantiert.

Auswertung

Die in vivo generierten Bilder wurden anschließend verblindet ausgewertet. Hierfür wurden unter anderem Programme zur Digitalisierung von Videos verwendet sowie die Bildanalysesoftware Image J (<https://imagej.net/ij/>).

Histologie

Postoperativ wurden die Tiere in tiefer Narkose mittels zervikaler Dislokation oder Perfusionsfixierung getötet und die Hirne wurden entnommen. Histologische Untersuchungen wurden entweder an gefrorenen Proben oder nach Perfusion der Tiere mit Paraformaldehyd 4% durchgeführt. Hierfür wurden die Hirne mittels eines Kryostaten, eines Mikrotoms oder eines Vibratoms geschnitten.

Gruppeneinteilung und Statistik

Die Tiere innerhalb einer Studie wurden den einzelnen Versuchsgruppen (Trauma, Scheinoperation, ggf. Therapie oder Placebo) randomisiert und verblindet per Losverfahren zugeteilt. Nach Erhebung aller Daten wurden diese verblindet ausgewertet. Anschließend wurde die Verblindung aufgehoben und die Daten analysiert. Für die statistische Auswertung wurden nicht parametrische Tests verwendet.

3. Charakterisierung der Veränderungen in der zerebralen Mikrozirkulation nach SHT

3.1. Mechanismen der Minderperfusion in der Penumbra nach SHT

Hintergrund

Unmittelbar nach Insult kommt es zu einem signifikanten Abfall der zerebralen Perfusion im Bereich der Penumbra, und zwar noch bevor dies durch einen Anstieg des ICPs mit konsekutiver Überlastung der zerebralen Compliance-Mechanismen erklärt werden kann (Bryan, Cherian, and Robertson 1995; Engel et al. 2008). Dies stellt eine klinisch hoch relevante Problematik dar, da eine zerebrale Ischämie rasch zum Absterben von Hirngewebe führt (Plesnila et al. 2003; Bouma et al. 1991; Bramlett and Dietrich 2004). Die zugrundeliegenden Mechanismen waren jedoch nicht geklärt. Ursächlich wurden unter anderem eine Vasokonstriktion, eine Schwellung der Endothelzellen im Rahmen der Ödembildung oder Thrombosen diskutiert (Sahuquillo, Poca, and Amoros 2001; Plesnila et al. 2003; Bullock et al. 1991; Stein et al. 2002).

Ziel der Studie und Versuchsaufbau

Auf Ebene der Mikrozirkulation wurden die Mechanismen, die den akuten Abfall der Durchblutung in der Penumbra nach SHT verursachen, mittels in vivo Fluoreszenzmikroskopie untersucht.

Ziel der Studie war die Beobachtung von Veränderungen des arteriellen Gefäßdurchmessers, der Leukozyten-Endothel Interaktion und der Bildung von Mikrothromben in pialen Arteriolen und Venolen innerhalb der ersten 120 Minuten nach SHT im Vergleich zu Ausgangswerten oder Scheinoperation.

Ergebnisse

Es zeigte sich, dass es unmittelbar nach Trauma zu einer Vasodilatation zerebraler Arterien kommt. Dementsprechend konnte eine arterielle Vasokonstriktion als Ursache für die posttraumatische Ischämie ausgeschlossen werden. Interessanterweise kam es jedoch nach Trauma zur Ausbildung von Leukozyten-Thrombozyten Aggregaten sowie von zerebralen Mikrothromben, die teilweise in zerebralen Arteriolen, vielmehr jedoch in zerebralen Venolen detektiert wurden. Dies ging einher mit einem signifikanten Abfall der Blutflussgeschwindigkeit in den jeweiligen Gefäßen und dem nachgeordneten Kapillargebiet. In scheinoperierten Tieren konnten keine derartigen Veränderungen der Mikrozirkulation beobachtet werden („*Temporal Profile of Thrombogenesis in the Cerebral Microcirculation after Traumatic Brain Injury in Mice*“, in *J Neurotrauma*)(Schwarzmaier et al. 2010).

Die Studie demonstriert, dass Mikrothromben eine wesentliche Ursache für die frühen Störungen der zerebralen Mikrozirkulation nach SHT darstellen. Des Weiteren zeigte sich eine Aktivierung intravasaler Leukozyten, die zu Bildung von Leukozyten-Thrombozyten Aggregaten führte sowie zu einer Interaktion mit der venösen Gefäßwand.

Aus diesen Ergebnissen ergaben sich weitere Fragestellungen a) nach den Mechanismen der beobachteten Prozesse auf zellulärer und subzellulärer Ebene und b) nach deren pathophysiologischer Wirkung, d.h. ob diese Mechanismen protektiv für das Gehirn sind oder den sekundären Hirnschaden verstärken.

3.2. Mechanismen und Effekt der arteriellen Vasodilatation nach Trauma

Ziel der Studie und Versuchsaufbau

In der Studie sollten die Mechanismen der oben beschriebenen arteriellen Vasodilatation sowie die Auswirkungen auf die Pathophysiologie nach SHT untersucht werden.

Hierfür wurde die endotheliale NO-Synthase (eNOS), ein bekanntes wesentliches Enzym für die Steuerung der Durchmesser von Gefäßen (Cherian, Hlatky, and Robertson 2004; Faraci and Brian 1994), medikamentös über einen NO-Synthase Inhibitor (VAS203) ausgeschaltet. Zudem wurde die Gefäßreaktion in Knockout Mäusen (eNOS -/-) untersucht. Wiederum wurde die Mikrozirkulation zunächst unter physiologischen Bedingungen und anschließend für 120 Minuten nach SHT beobachtet.

Ergebnisse

Nach Inhibition der eNOS konnte der dilatative Effekt in den Arteriolen post-Trauma deutlich reduziert werden („*Endothelial Nitric Oxide Synthase Mediates Arteriolar Vasodilatation After Traumatic Brain Injury in Mice*“ in *J Neurotrauma* (Schwarzmaier et al. 2015)). Eine Verminderung der Perfusion über das bekannte Maß hinaus wurde nicht beobachtet. Nach Scheinoperation kam es nicht zu einem Anstieg des Gefäßdurchmessers der Arteriolen. Die Inhibition von eNOS hatte in den scheinoperierten Tieren keinen Effekt auf den Gefäßdurchmesser. Die Dilatation der Arteriolen ist demnach zumindest teilweise durch die eNOS vermittelt. Der protektive Effekt von der medikamentösen Reduktion des Durchmessers im arteriellen („Hochdruck“) Stromgebiet basiert wahrscheinlich auf einer Erhöhung der zerebralen Compliance, da mehr Platz für eine zerebrale Schwellung zu Verfügung steht.

3.3. Bildung von Mikrothromben nach SHT

Hintergrund:

Die Bildung von Mikrothromben kann protektive und schädliche Auswirkungen haben. Störungen der Mikrozirkulation, die eine Minderperfusion verursachen, sind sicher schädlich. Im Gegensatz dazu hätte die Verhinderung von Blutungen durch Mikrothromben oder ein Abdichten der Blut-Hirn-Schranke einen protektiven Effekt. Im klinischen Alltag wird eine Antikoagulation nach Schädel-Hirn-Trauma sehr kritisch gesehen, da hier vor allem ein weiterer Schaden durch intrazerebrale Blutungen verhindert werden muss (Maas, Stocchetti, and Bullock 2008; Stein and Smith 2004).

Obwohl die Mikrothromben eindeutig mit einer signifikanten Minderperfusion in den betroffenen Gefäßen korrelierten (Schwarzmaier et al. 2010), war somit bei einem therapeutischen Ansatz vor allem die Verhinderung von Blutungskomplikationen zu berücksichtigen.

Ziel der Studie und Versuchsaufbau

Ziel der folgenden Studie war es einerseits, die Mikrothrombosen zu reduzieren, welche zu einer Perfusionsminderung führen, und andererseits keine zerebralen Blutungskomplikationen zu verursachen.

Für diese Studie wurde deshalb Faktor XI untersucht, ein Faktor, welcher der plasmatischen Gerinnung zugerechnet wird und der keine maßgebliche Rolle für die primäre Hämostase spielt (Berndt et al. 1995; Rivera et al. 2009). In der Studie wurde Faktor XI medikamentös inhibiert oder in Knockout Mäusen untersucht. Die Inhibition von Faktor XI wurde anhand einer deutlichen Veränderung der aktivierten partiellen Thromboplastinzeit (aPTT) bei den Mäusen verifiziert. Die Veränderungen der Mikrozirkulation wurden 1,5-2,5 Stunden nach Trauma oder Scheinoperation beobachtet und die Auswirkungen der Therapie auf die sekundäre Nekrose-Ausbreitung nach 24 Stunden evaluiert.

Ergebnisse

Es zeigte sich keine Veränderung von zerebraler Thrombogenese, sekundärer Nekrose-Ausbreitung oder Schwellung der ipsilateralen Hemisphäre im Vergleich zur Kontrollgruppe (*„The Formation of Microthrombi in Parenchymal Microvessels after Traumatic Brain Injury Is Independent of Coagulation Factor XI“ in J Neurotrauma*)(Schwarzmaier et al. 2016). Allerdings wurde auch keine Zunahme oder Verschlimmerung von intrazerebralen Blutungen beobachtet.

Demnach spielt Faktor XI für die Entwicklung der zerebralen Mikrothromben keine maßgebliche Rolle. Da eine Inhibition von Faktor XI in der Studie jedoch zu einer signifikanten Verlängerung der aPTT

fürte, ohne die intrazerebrale Blutung zu verstärken, könnte dies einen vielversprechender Ansatz für eine Antikoagulation bei Patienten mit SHT zur Thromboseprophylaxe (z.B. TVT) darstellen.

3.4. Einfluss von Leukozyten auf die sekundäre Nekrose-Ausbreitung nach SHT

Hintergrund

Eine inflammatorische Komponente, welche die sekundäre Nekrose-Ausbreitung verstärkt, wurde in der Literatur vielfach diskutiert (Holmin et al. 1995; Jassam et al. 2017; Sahuquillo, Poca, and Amoros 2001). Auch in unserer Studie (siehe 3.1.) zeigten sich bereits in der Akutphase nach Trauma vermehrt Leukozyten-Thrombozyten Aggregate wie auch einzelne Leukozyten, die mit dem Endothel (vor allem in post-kapillären Venolen) interagierten, d.h. an der Gefäßwand entlang rollten oder adhärten (Schwarzmaier et al. 2010). Dies wird als Leukozyten-Endothel-Interaktion (LEI) bezeichnet. Ein kausaler Zusammenhang zwischen Inflammation und sekundärer Nekrose-Ausbreitung sowie die zugrundeliegenden Mechanismen waren jedoch nicht ausreichend untersucht.

Ziel der Studie und Versuchsaufbau

Ziel war die Untersuchung der Rolle der intravaskulären Inflammation für die sekundäre Nekrose-Ausbreitung nach experimentellem SHT.

Hierfür wurde die intravaskuläre LEI zu unterschiedlichen Zeitintervallen bis 18 Stunden nach Trauma mittels Intravitalmikroskopie beobachtet und die Migration inflammatorischer Zellen bis 48 Stunden nach Trauma anhand von histologischen Schnitten untersucht.

Ergebnisse

Nach Trauma zeigte sich eine deutliche Zunahme der LEI und Aggregat- Endothel- Interaktion (Rollen an der Gefäßwand sowie Adhäsion) im Vergleich zur scheinoperierten Gruppe („*In vivo temporal and spatial profile of leukocyte adhesion and migration after experimental traumatic brain injury in mice*“ in *J Neuroinflammation*)(Schwarzmaier et al. 2013). Eine medikamentöse Inhibition dieses Effekts über eine Inhibition des Adhäsionsmoleküls CD18 hatte jedoch keine Auswirkung auf die sekundäre Nekrose-Ausbreitung. Des Weiteren zeigte sich, dass Leukozyten in das Gewebe von Kontusion und Penumbra einwanderten, allerdings erst *nachdem* das Gewebe nekrotisch geworden war. Hierbei handelte es sich vor allem um Monozyten und Granulozyten. Es wurden keine migrierenden T- oder B-Lymphozyten detektiert. Diese Studie demonstriert, dass weder die intravaskuläre LEI noch eine Migration der Leukozyten eine relevante Rolle für die sekundäre Nekrose-Ausbreitung innerhalb der ersten 24 Stunden nach SHT spielen.

3.5. Diskussion und Bedeutung für das wissenschaftliche Feld

Die verminderte zerebrale Perfusion in der Penumbra wurde vielfach beschrieben (Engel et al. 2008; Bryan, Cherian, and Robertson 1995; Robertson et al. 1992). So wurde die Perfusion in verschiedenen Hirnarealen mittels Laser Doppler Flow (Bryan, Cherian, and Robertson 1995) oder in vivo Fluoreszenzmikroskopie pialer Gefäße (Hartl, Medary, et al. 1997b) beobachtet. In diesen Studien spielte jedoch Anästhesie, Beatmung und Überwachung der physiologischen Parameter keine oder nur eine untergeordnete Rolle. Untersuchungen der Mechanismen wurden nur ex vivo, d.h. beispielsweise in histologischen Untersuchungen (Dietrich et al. 1998; Whalen et al. 1998) oder mit Autoradiographie (Engel et al. 2008) durchgeführt. Ex vivo Methoden bieten keine Möglichkeit der dynamischen Messung und können das komplexe Zusammenspiel von Prozessen in der Mikrozirkulation nicht ausreichen abbilden.

Mit der hier beschriebenen Methode der Intravitalmikroskopie war erstmals eine Untersuchung in vivo, in einem klinisch relevanten tierexperimentellen SHT-Modell und in Kombination mit einem hochwertigen Anästhesie- und Überwachungsprotokoll möglich.

Mit den oben angeführten Studien wurde gezeigt, dass die initiale Reduktion der Perfusion nicht durch eine arterielle Vasokonstriktion verursacht wird sondern durch die Bildung von Mikrothromben und Leukozyten-Thrombozyten Aggregaten. Diese entstehen bereits innerhalb der ersten zwei Stunden nach Trauma und gehen mit einer deutlichen Reduktion der zerebralen Durchblutung einher.

Arterieller Gefäßdurchmesser

Bisher wurde neben der Bildung von Thromben auch eine arterielle Vasokonstriktion beziehungsweise eine Lumenverengung aufgrund einer Schwellung von Gliazellen als Ursache für die posttraumatische zerebrale Minderperfusion diskutiert (Bullock et al. 1991; Schroder et al. 1995). Andere Studien wiederum beschrieben eine Dilatation der Arteriolen (Dewitt et al. 1986; Hartl, Medary, Ruge, Arfors, Ghahremani, et al. 1997). Mit unserer Studie haben wir gezeigt, dass Arteriolen innerhalb der ersten Minuten nach Trauma dilatieren und dieser Effekt mindestens bis 120 Minuten nach Trauma anhält. Interessanterweise dilatieren die Arteriolen also noch vor der Entstehung eines Hirnödems und einer sich daraus entwickelnden intrakraniellen Hypertonie. Während Venolen bei steigendem ICP drainiert werden, ist das im arteriellen Stromgebiet aufgrund der höheren intravasalen Druckwerte nicht möglich. Die arterielle Gefäßerweiterung führt demnach zu einer Reduktion der zerebralen Compliance-Mechanismen nach Trauma und beschleunigt bzw. befördert den intrakraniellen Druckanstieg.

Weiterhin wurde gezeigt, dass die Vasodilatation zumindest teilweise durch eNOS vermittelt ist und durch Gabe eines NOS Inhibitors (VAS203) vermindert werden kann. Interessanterweise zeigte die

Inhibition der NO Synthesen mittels VAS203 in einer weiteren Studie aus unserer Arbeitsgruppe positive Effekte nach SHT, wie eine Verminderung des ICPs, eine Reduktion des Hirnödems und eine Verbesserung des neurologischen Outcomes (Terpolilli et al. 2009). Der protektive Effekt in der Frühphase nach Trauma wird dadurch erklärt, dass die Verminderung der Gefäßerweiterung im arteriellen Stromgebiet zu einer Erhöhung der zerebralen Compliance führt und damit den Anstieg des ICP verzögert. Im weiteren Verlauf ist am ehesten die Inhibition der induzierbaren NO Synthase (iNOS) maßgeblich für die neuroprotektiven Effekte.

Bildung von Mikrothromben

Mikrothromben waren bereits in histologischen Untersuchungen sowohl tierexperimentell (Dietrich, Alonso, and Halley 1994; Lu et al. 2004) wie auch in klinischen Studien (Stein et al. 2004) beschrieben worden. Es war jedoch unklar, ob die Thromben Ursache der Durchblutungsstörungen sind oder erst im späteren Verlauf als Folge von Minderperfusion entstehen.

Eine direkte Korrelation von Thrombosebildung und folgender Abnahme der Blutflussgeschwindigkeit konnte erst mit unserer Studie gezeigt werden. Die therapeutische Intervention gestaltet sich jedoch schwierig. Dies liegt vor allem daran, dass Blutungskomplikationen unbedingt vermieden werden müssen. Mit dem Ansatz Faktor XI zu hemmen konnte leider kein protektiver Effekt erreicht werden. Allerdings wurden auch keine Zunahme zerebraler Blutungskomplikationen beobachtet. Dies ist klinisch relevant, da eine prophylaktische Antikoagulation von Patienten nach SHT ein häufiges Problem im klinischen Alltag darstellt (Maegle et al. 2017; Steyerberg et al. 2019). Weitere Untersuchungen zur Thromboseprophylaxe nach SHT mittels Inhibition von Faktor XI wären - vor allem für die Therapie von immobilisierten Patienten - von großem klinischen Interesse.

In einer weiteren Studie in Kollaboration mit Prof. S. Thal, Universität Mainz, wurde der Effekt von Plasminogen Activator Inhibitor-1 auf die Pathophysiologie nach SHT untersucht. Plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) hemmt die Fibrinolyse und verstärkt die Bildung von Mikrothromben. Die Hypothese war, dass eine Dysregulation der Fibrinolyse zu Mikrothrombosen und sekundär zu weiteren Hirnschaden führt. Eine Hemmung von PAI-1 mit PAI-039 reduzierte das sekundäre Nekrosewachstum und verbesserte die neurologische Funktion. Intravitalmikroskopisch zeigten sich weniger Thrombosen in der Penumbra. Die Studie zeigt, dass die Beeinträchtigung der Fibrinolyse nach Trauma mit einem größeren sekundären Hirnschaden einhergeht (*„Plasminogen Activator Inhibitor-1 Augments Damage by Impairing Fibrinolysis after Traumatic Brain Injury“ in Annals of Neurology*) (Griemert et al. 2019).

Intravaskuläre Inflammation und Leukozyten-Endothel Interaktion

Die inflammatorische Reaktion nach SHT wurde vielfach untersucht (Bourgeois-Tardif et al. 2021; Jassam et al. 2017; Schwarzmaier and Plesnila 2014). Sie kann in eine intravaskuläre und eine intraparenchymale Komponente eingeteilt werden. Andererseits gibt es eine zeitliche Einteilung in eine akute (Auftreten wenige Stunden nach SHT), eine subakute (Tage) und eine langfristige (Wochen bis Monate) Immunreaktion. Sowohl protektive wie auch schädliche Aspekte wurden je nach System und Zeitpunkt nach SHT beschrieben (Jassam et al. 2017). Auf Ebene der intravaskulären Inflammation führte beispielsweise die Depletion von Neutrophilen nach experimentellem SHT zu einer Reduktion des Hirnödems (nach 48 Stunden) und des Kontusionsvolumens (nach 7 und 14 Tagen) (Kenne et al. 2012). Ein protektiver Effekt wurde auch in einem anderen experimentellen SHT-Modell, das vor allem einen diffusen Axonschaden verursacht (Fluid Percussion Injury) beschrieben (Bao et al. 2012; Utagawa et al. 2008). Andere Studien konnten jedoch keinen Zusammenhang zwischen einer intravaskulären Inflammation und dem akuten Hirnschaden nach SHT feststellen (Whalen et al. 1999; Hartl, Medary, et al. 1997a).

Mit unserer Studie wurde der Einfluss der LEI auf die sekundäre Nekrose-Ausbreitung nach experimentellem SHT untersucht. Somit lag der Fokus auf der intravasalen Immunreaktion einerseits und der akuten Phase nach experimentellem SHT andererseits. Obwohl eine ausgeprägte intravaskuläre Inflammation beobachtet wurde, zeigte die medikamentöse Inhibition der LEI keinen Einfluss auf die sekundäre Nekrose-Ausbreitung nach 24 Stunden. Dies erlaubt jedoch keine Aussage über die Rolle der intravaskulären Inflammation in der subakuten und langfristigen Phase nach SHT (Jassam et al. 2017; Jha, Kochanek, and Simard 2019). Pathophysiologische Prozesse, die nach den ersten 24 bis 48 Stunden eine Rolle spielen, könne durchaus von einer Entzündungsreaktion beeinflusst werden.

Zudem wurde in unserer Studie nur das CD18 Adhäsionsmolekül inhibiert. Je nach Subtyp der inflammatorischen Zellen wird die LEI jedoch über unterschiedliche Adhäsionsmoleküle vermittelt (Mazzone & Ricevuti, 1995; Wilkes, 2006). Während CD11a/CD18 auf allen myeloiden Zellen exprimiert wird, werden beispielsweise CD11b/CD18 und CD11c/CD18 vor allem auf Monozyten, Makrophagen oder Natural Killer Zellen exprimiert.

Um die Rolle der intravaskulären Inflammation für den sekundären Hirnschaden genauer zu untersuchen, müssen deshalb in zukünftigen Studien zwei Aspekte berücksichtigt werden: Einerseits der zeitliche Faktor, mit Fokus auf den sekundären Hirnschaden, welcher im Verlauf von Tagen und Wochen eintritt. Andererseits eine spezifischere Untersuchung der einzelnen inflammatorischen Zellen, deren Adhäsion und Einwanderung ins Gehirn über unterschiedliche Adhäsionsmoleküle

vermittelt werden. Neben möglichen protektiven Effekten unterscheiden sich die Therapieansätze wahrscheinlich auch in ihrem Nebenwirkungsprofil (Immunsuppression). Dies ist vor allem relevant in Bezug auf protektive inflammatorische Effekte wie beispielsweise neuronales Remodelling.

In einer Übersichtsarbeit hat die Autorin dieser Arbeit die Daten zusammengefasst, welche die Entzündungsreaktion nach Trauma in vivo untersucht haben. Insgesamt zeigte sich, dass die systemische zelluläre Inflammation (Leukozyten) nach Trauma einen eher geringen Einfluss auf die sekundäre Nekrose-Ausbreitung hat. Der Effekt auf den sekundären Hirnschaden in Bezug auf neurologische Funktion, Remodelling und Langzeitschäden ist nicht vollständig geklärt. Die residuale Inflammation, vor allem die Aktivierung von Mikroglia, kann protektive und pathologische Auswirkungen auf den sekundären Hirnschaden haben, wobei die Aktivierung in der akuten Phase (Stunden) eher protektiv zu sein scheint, während sich eine chronische Aktivierung eher negativ auswirkt (*„Contributions of the immune system to the pathophysiology of traumatic brain injury – evidence by intravital microscopy“ in Frontiers in Cellular Neuroscience, invited Review*)(Schwarzmaier and Plesnila 2014).

3.6. Limitationen

Die oben beschriebenen Studien untersuchen alle die Pathophysiologie in der akuten Phase, d.h. innerhalb der ersten 24 (bis 48) Stunden nach experimentellem SHT. Innerhalb dieser Zeit ist die histologisch quantifizierbare sekundäre Nekrose-Ausbreitung nach CCI abgeschlossen (Zweckberger et al. 2006; Kochanek et al. 1995). Klinisch sowie tierexperimentell ist jedoch bekannt, dass es auch nach dieser akuten Phase zu sekundären Pathologien (d.h. einem sekundären Hirnschaden) kommen kann (Jha, Kochanek, and Simard 2019; Maas, Stocchetti, and Bullock 2008). Insbesondere die Entzündungsreaktion durchläuft verschiedene Phasen, in welchen unterschiedliche zelluläre und molekulare Mechanismen die Pathophysiologie nach SHT beeinflussen können (Plesnila 2016; Jassam et al. 2017; Morganti-Kossmann et al. 2002).

Die Aussagen der hier aufgeführten therapeutischen Studien sind auf die sekundäre Nekrose-Ausbreitung nach 24 Stunden beschränkt (mit Ausnahme der Studie zu PAI-Hemmung, hier war der Untersuchungszeitraum fünf Tage). Die neurologische Funktion nach Therapie und/oder die langfristigen Auswirkungen der Therapien auf den sekundären Hirnschaden müssen zu späteren Zeitpunkten nach SHT untersucht werden, d.h. nach 1-2 Wochen, und zusätzlich, wie in entsprechenden Studien am Menschen, nach drei oder sechs Monaten.

Eine weitere relevante Limitation für die Untersuchungen in vivo war die Eindringtiefe in das Gewebe. Mit der Auflicht-Fuoreszenzmikroskopie, die in den ersten Studien verwendet wurde, konnte nur die

Oberfläche, das heißt nur die piale Mikrozirkulation, untersucht werden. Eine Untersuchung der tieferen Gewebeschichten war nicht möglich. Deswegen wurde in den folgenden Studien auch die 2-Photonen Mikroskopie eingesetzt, mit der auch das Parenchym untersucht werden konnte.

3.7. Weiterentwicklung des Modells

Die Beschränkung der Untersuchungsebene wurde durch die Technik der 2-Photonenmikroskopie (2PM) überwunden (Helmchen and Denk 2005). Hierbei werden Fluoreszenzmoleküle mit sehr kurzen (Femtosekunden) Laserpulsen angeregt. Am Ort der höchsten Photonendichte, d.h. im Fokuspunkt des verwendeten Objektivs, kommt es zum 2-Photonen-Effekt (Goepfert-Mayer 1931): dort gelegene Fluoreszenzmoleküle nehmen zwei langwellige, energiearme Photonen auf, geben aber nur ein Photon mit der doppelten Energie/Wellenlänge wieder ab. Dieser Effekt hat viele Vorteile: durch die Verwendung langwelliger Anregungslichts können Photonen tief in das Gewebe eindringen. Damit ist eine Untersuchung des Gewebes bis zu einer Tiefe von 500 µm, das bedeutet innerhalb der ersten Zellschichten des Kortex, möglich. Zudem kann aufgrund der punktuellen Fluoreszenzentstehung und des damit verbundenen sehr hohen Signal-zu-Rauschverhältnisses mit relativ geringer Intensität angeregt werden. Dadurch wird ein phototoxischer Schaden oder ein Ausbleichen des Gewebes deutlich reduziert und die detaillierte 3D-Bildgebung des Gewebes in vivo ermöglicht. In zwei der bislang genannten Studien kam die 2PM ergänzend zum Einsatz. So konnte die oben beschriebene Leukozyten-Endothel Interaktion sowie die Bildung von Mikrothromben nach Trauma auch im zerebralen Parenchym gezeigt werden (Schwarzmaier et al. 2013; Schwarzmaier et al. 2016).

Mit Hilfe der 2PM wurden die Untersuchungsmöglichkeiten der Antragstellerin deutlich erweitert und verfeinert. Mit den neuen technischen Möglichkeiten konnten nun weitere relevante Fragestellungen zu zerebrovaskulären Veränderungen nach SHT bearbeitet werden. Zudem wurde das Zeitfenster der Untersuchungen deutlich ausgeweitet, das heißt von 24 Stunden auf 7 Tage.

4. Charakterisierung des vasogenen Hirnödems nach SHT

Hintergrund

Nach SHT kommt es zur Ausbildung eines Hirnödems mit konsekutiver Schwellung des Gewebes und einem Anstieg des intrakraniellen Druckes, sobald die zerebrale Compliance ausgereizt ist (Jha, Kochanek, and Simard 2019; Donkin and Vink 2010). Es wird vor allem zwischen vasogenem Ödem (Vasogenic Brain Edema, VBE) und zytotoxischem Ödem (Cytotoxic Brain Edema, CBE) unterschieden (Klatzo 1967; Unterberg et al. 2004). Weitere Ödemformen, wie ionisches (osmotisches), interstitielles (hydrocephales) oder hydrostatisches Ödem spielen nach Trauma wahrscheinlich nur eine untergeordnete Rolle (Unterberg et al. 2004; Badaut 2017).

Das VBE wird durch einen pathologischen Anstieg der Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke (Blood Brain Barrier, BBB) verursacht und breitet sich im Interstitium aus. Es kommt zu einer Extravasation von proteinreicher Flüssigkeit und zu einem netto Anstieg des intrakraniellen Wassergehaltes und Volumen. Im Gegensatz dazu entsteht das CBE intrazellulär, vor allem in Astrozyten, welche unter anderem für die Aufrechterhaltung der extrazellulären Homöostase im Gehirn zuständig sind. Werden durch ein Trauma größere Mengen toxischer Substanzen, z.B. Glutamat, Kaliumionen oder Protonen, freigesetzt, werden diese gemeinsam mit Na-Ionen und Wasser von Astrozyten aufgenommen und es kommt zur Zellschwellung. (Jha, Kochanek, and Simard 2019; Donkin and Vink 2010; Lukaszewicz, Soyer, and Payen 2011; Maas, Stocchetti, and Bullock 2008; Plesnila 2017; Kempinski 2001).

Bislang war jedoch nicht geklärt, welche Form des Hirnödems nach SHT dominiert und wie sich der genaue zeitliche Verlauf der Ödementstehung darstellt. Auch die zugrundeliegenden Mechanismen waren nicht ausreichend untersucht (Jha, Kochanek, and Simard 2019; Grande and Romner 2012; Maas, Stocchetti, and Bullock 2008; Donkin and Vink 2010).

Dies lag auch daran, dass die Untersuchungsmöglichkeiten zu VBE und CBE technisch deutlich reduziert waren. Sie waren beschränkt auf ex vivo Ansätze, die nur eine punktuelle und keine dynamische Untersuchung erlauben. Es gab auch in vivo Ansätze, zum Beispiel mittels MRT oder Auflichtmikroskopie, welche jedoch nur eine indirekte Bestimmung des Ödems mit vergleichsweise geringer Auflösung ermöglichten und oft keine saubere Differenzierung zwischen VBE und CBE erlaubten (Jha, Kochanek, and Simard 2019; Donkin and Vink 2010). Mit Hilfe der 2PM war nun eine detaillierte in vivo Messung der Ödementstehung möglich. Zunächst wurde ein Modell zur Charakterisierung des VBE nach SHT etabliert.

4.1. Identifizierung der vaskulären Quelle

Ziel der Studie und Versuchsaufbau

Die Entstehung des VBE sollte in vivo, im Gewebe der Penumbra und in Abhängigkeit der Gefäßkategorie charakterisiert werden.

Als Parameter für die Entstehung des VBE wurde die Extravasation eines fluoreszierenden Farbstoffes mit einem Molekulargewicht von 40 kDa verwendet (Albumin hat etwa 70 kDa). Dieser Farbstoff (Tetramethylrhodamin, TMRM) kann die BBB nur unter pathophysiologischen Bedingungen überwinden (Reyes-Aldasoro et al. 2008). Nach Trauma wurde den Tieren TMRM intravaskulär verabreicht und unmittelbar anschließend wurde das Gewebe mittels 2PM untersucht. Anschließend wurde die Extravasation in das Parenchym alle 30 Minuten für insgesamt 90 Minuten untersucht. In der Auswertung mit der Bildanalysesoftware *Image J* wurde die Fluoreszenzintensität im Parenchym

sowie unmittelbar im perivaskulären Raum von Arteriolen und Venolen nach Trauma oder Scheinoperation bestimmt.

Ergebnisse

Diese Studie zeigte, dass es nach experimentellem SHT zu einer deutlichen Zunahme der Extravasation über die BBB im Vergleich zur scheinoperierten Gruppe kommt (*„Identification of the Vascular Source of Vasogenic Brain Edema following Traumatic Brain Injury Using In Vivo 2-Photon Microscopy in Mice“ in J Neurotrauma*)(Schwarzmaier, Gallozzi, and Plesnila 2015). Die Extravasation war in der Penumbra am deutlichsten ausgeprägt und in Arteriolen oder Venolen ähnlich stark, jedoch insgesamt weniger ausgeprägt als die Gesamtextravasation. Hieraus ergibt sich, dass das VBE in der akuten Phase vor allem über eine Extravasation aus zerebralen Kapillaren verursacht wird.

4.2. Zeitlicher Verlauf

Hintergrund

Im klinischen Alltag stellt das Hirnödem mit konsekutivem intrakraniellen Hypertonus eine häufige und wichtige Problematik innerhalb der ersten Tage bis Wochen nach SHT dar (Jha, Kochanek, and Simard 2019). Bisher war jedoch umstritten, welche Form des Ödems zu welchem Zeitpunkt nach SHT auftritt (Unterberg et al. 2004; Jha, Kochanek, and Simard 2019; Donkin and Vink 2010). Dies ist vor allem deshalb relevant, da sich aufgrund der unterschiedlichen Pathophysiologie unterschiedliche therapeutische Ansätze ergeben.

Ziel der Studie und Versuchsaufbau:

Die Ausbildung des VBE sollte bis sieben Tage nach experimentellem SHT charakterisiert werden. Hierfür wurde die Extravasation von TMRM in das Parenchym zu verschiedenen Zeitpunkten, d.h. 4, 24, 48, 72 Stunden und 7 Tage nach Trauma oder 48 Stunden nach Scheinoperation, mittels in vivo 2-PM untersucht.

Ergebnisse:

Die Studie zeigt, dass sich die Öffnung der BBB in zwei Phasen unterteilt (*„Longitudinal Characterization of Blood–Brain Barrier Permeability after Experimental Traumatic Brain Injury by In Vivo 2-Photon Microscopy“ in J Neurotrauma*)(Hu et al. 2021). Die erste Phase entsteht innerhalb der ersten Stunden nach Trauma und ist wahrscheinlich auf akute Schädigungsmechanismen wie Gefäßzerrungen mit direkter Schädigung der Gefäßwand zurückzuführen. Die VBE Entstehung (genauer: die Geschwindigkeit der Extravasation des Fluoreszenzmarkers) ist 24 Stunden nach Trauma,

zum Zeitpunkt der größten Ausprägung der sekundären Nekrose-Ausbreitung, zunächst rückläufig. Interessanterweise gibt es jedoch eine zweite Phase, die sich ab 48 Stunden nach Trauma ausbildet und erst sieben Tage nach Trauma rückläufig ist.

4.3. Diskussion und Bedeutung für das wissenschaftliche Feld

Lange Zeit wurde postuliert, dass der strukturelle Hirnschaden nach SHT innerhalb von wenigen Stunden bis maximal Tagen entsteht und sich anschließend nicht mehr signifikant verändert. Neue Studien zeigen jedoch, dass es auch Tage, Wochen und Monate nach Trauma noch zu sekundären Schädigungen kommen kann (Steyerberg et al. 2019; Jha, Kochanek, and Simard 2019; Stocchetti and Maas 2014).

Die hier aufgeführten Ergebnisse zeigen, dass die Ödementstehung bis sieben Tage nach SHT auftritt, also noch lange nachdem die sekundäre Nekrose-Ausbreitung ihr Maximum erreicht hat. Dies kann zu weiteren neurologischen Defiziten führen (sekundärer Hirnschaden). Durch die zeitliche Verzögerung kommen Mechanismen infrage, die ebenfalls zeitlich verzögert auftreten. Hierbei sind vor allem inflammatorische Reaktionen als auslösende Faktoren denkbar, wie beispielsweise eine Aktivierung intravaskulärer Leukozyten oder der residenter Mikroglia, sowie die Effekte von Chemokinen und Zytokinen, beispielsweise Interleukine (z.B. IL2), Metalloproteinasen (z.B. MMP-9), Bradykinin (B2) oder Perforin. Auch ein Absterben von Endothelzellen oder Perizyten, entweder aufgrund einer Minderperfusion oder einer inflammatorischen Reaktion, kommt als Schädigungsmechanismus der BBB infrage (Jha, Kochanek, and Simard 2019; Lukaszewicz, Soyer, and Payen 2011; Donkin and Vink 2010). Dies eröffnet neue therapeutische Optionen: Einerseits erweitert sich das therapeutische Fenster für Interventionen. Andererseits könnten mit antiinflammatorischen Therapien erstmals kausale - nicht nur symptomatische - Behandlungsmöglichkeiten entwickelt werden.

4.4. Limitationen

Mit der Methode der 2PM kann das VBE detailliert in vivo untersucht werden. Allerdings ist der Fokus räumlich auf einen kleinen Teil des Gehirns eingeschränkt (ein Untersuchungsfeld misst etwa 425 x 425 x 300 µm (Länge x Breite x Tiefe), maximal sind bis zu 500 µm Eindringtiefe mit guter Auflösung möglich. Informationen zu Geschehnissen im gesamten Gehirn wären jedoch wünschenswert. Zudem gibt es bislang nur ein 2PM Modell für die Untersuchung des VBE und nicht für das CBE. Auch hier wäre eine detaillierte Charakterisierung in Bezug auf zeitliche und örtliche Ausbreitung sowie eine genauere Beschreibung der Mechanismen dringend erforderlich, um neue Therapien zu entwickeln. Entsprechende Methoden werden gerade in der Arbeitsgruppe entwickelt.

5. Aktueller Stand und Ausblick

Die aufgeführten Studien haben wichtige Fragen zur Mikrozirkulation, Inflammation und Ödementstehung beantwortet. Es haben sich jedoch auch neue Fragestellungen ergeben, die in zukünftigen Studien untersucht werden könnten. Hierbei werden aktuell vor allem zwei Ansätze verfolgt: Die Untersuchung der Mechanismen der VBE Entstehung sowie die Charakterisierung des CBE nach experimentellem SHT.

Ursachen der verzögerten VBE Entstehung

Hierfür kommen vor allem Mechanismen infrage, die sich über einen längeren Zeitraum entwickeln oder prolongiert beziehungsweise chronisch auftreten. Dies sind beispielsweise inflammatorische Reaktionen, wobei sowohl intravaskuläre wie auch intraparenchymatöse Prozesse eine Rolle spielen können (Jassam et al. 2017; Jha, Kochanek, and Simard 2019; Donkin and Vink 2010; Schwarzmaier and Plesnila 2014). Wichtige Fragestellung für zukünftige Projekte sind demnach die Rolle der intravaskulären und der intraparenchymatösen Inflammation für die Entstehung der verzögerten Phase des VBE.

Charakterisierung des zytotoxischen Ödems nach experimentellem SHT

Das zytotoxische Hirnödem wurde bisher nicht in vivo charakterisiert, da dies bislang aufgrund technischer Limitationen nicht möglich war. Es gibt jedoch Hinweise darauf, dass das CBE sowohl nach Trauma wie auch in weiteren zerebralen Schädigungen eine relevante Rolle spielt (Donkin and Vink 2010; Jha, Kochanek, and Simard 2019; Unterberg et al. 2004; Marmarou 2003). Aktuell werden zwei Methoden entwickelt, die eine detaillierte Untersuchung des CBE in vivo ermöglichen. Die erste Methode basiert auf in vivo 2-Photonenmikroskopie an Mäusen, bei deren ein Fluoreszenzmolekül im Zytosol von Astrozyten exprimiert wird (Kim et al. 2018). Die zweite Methode beruht auf einem neuen Protokoll für Magnetresonanztomographie (MRT), welches die Differenzierung von extrazellulärem und intrazellulärem Wasser erlaubt (Free Water Diffusion MRI)(Pasternak et al. 2009; Duering et al. 2018). Mit dieser Methode können CBE und VBE im gesamten Gehirn dargestellt werden. Zudem ist die Bildgebung nicht-invasiv, sodass die Tiere repetitiv untersucht werden können.

6. Danksagung

Die Fertigstellung dieser Arbeit war nur durch vielseitige Unterstützung möglich, für die ich mich bedanken möchte.

Zuerst möchte ich mich bei meinem Doktorvater und Mentor Professor Dr. Nikolaus Plesnila bedanken. Für die sehr gute und produktive Zusammenarbeit, für viele interessante Ideen, lehrreiche Diskussionen, lustige und spannende Kongressreisen, und die wissenschaftliche Unterstützung über viele Jahre.

Ohne die Unterstützung von Doktoranden gäbe es viele der Studien nicht. Ich möchte mich bedanken bei Dr. Matilde Balbi, Dr. Niamph McGarry, Maximilian Knarr, Dr. Yue Hu und Senbin Hu für ihr Engagement, für die vielen Fragen und Diskussionen, in denen ich viel gelernt habe - und vor allem für die sehr nette und gute Zusammenarbeit.

Bereits während meiner Doktorarbeit habe ich PD Dr. Nicole Terpolilli kennengelernt, die wissenschaftlich immer eine gute Idee hat und zudem eine hervorragende Begleiterin auf Kongressreisen ist – danke!

Dank geht an Herrn Professor Dr. Zwißler für die Unterstützung meiner wissenschaftlichen Arbeit sowie für meine lehrreiche Zeit in der Klinik für Anästhesiologie.

Zudem möchte ich mich bei PD Dr. Thomas Weig bedanken für die Unterstützung meiner Habilitation sowie für die gute und lehrreiche klinische Ausbildung im Bereich der Intensivmedizin.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei meiner Familie und meinen Freunden bedanken, die mich bestärkt haben, wenn die Experimente mal wieder schwierig und aufreibend waren. Vielen Dank für die Unterstützung, aber vor allem danke für Ablenkung, Spaß und Entspannung außerhalb des Labors!

7. Publikationsverzeichnis

A) Originalarbeiten als Erst- oder Letztautorin

1. Perfusion pressure determines vascular integrity and histomorphological quality following perfusion fixation of the brain.
Schwarzmaier SM, Knarr MRO, Hu S, Ertürk A, Hellal F, Plesnila N.
J Neurosci Methods. 2022 Feb
2. Longitudinal Characterization of Blood-Brain Barrier Permeability after Experimental Traumatic Brain Injury by In Vivo 2-Photon Microscopy
Hu Y, Seker B, Exner C, Zhang J, Plesnila N, **Schwarzmaier SM**.
J Neurotrauma. 2021 Feb 15.
3. The Formation of Microthrombi in Parenchymal Microvessels after Traumatic Brain Injury Is Independent of Coagulation Factor XI
Schwarzmaier SM, de Chaumont C, Balbi M, Terpolilli NA, Kleinschnitz C, Gruber A, Plesnila N.
J Neurotrauma. 2016 Sep 1
4. Identification of the Vascular Source of Vasogenic Brain Edema following Traumatic Brain Injury Using In Vivo 2-Photon Microscopy in Mice
Schwarzmaier SM, Gallozzi M, Plesnila N.
J Neurotrauma. 2015 Jul 1
5. Endothelial nitric oxide synthase mediates arteriolar vasodilatation after traumatic brain injury in mice.
Schwarzmaier SM, Terpolilli NA, Dienel A, Gallozzi M, Schinzel R, Tegtmeyer F, Plesnila N.
J Neurotrauma. 2015 May 15
6. In vivo temporal and spatial profile of leukocyte adhesion and migration after experimental traumatic brain injury in mice.
Schwarzmaier SM, Zimmermann R, McGarry NB, Trabold R, Kim SW, Plesnila N.
J Neuroinflammation. 2013 Feb 28
7. Temporal profile of thrombogenesis in the cerebral microcirculation after traumatic brain injury in mice.
Schwarzmaier SM, Kim SW, Trabold R, Plesnila N.
J Neurotrauma. 2010 Jan

B) Übersichtsartikel/Reviews

1. Contributions of the immune system to the pathophysiology of traumatic brain injury - evidence by intravital microscopy.
Schwarzmaier SM, Plesnila N.
Front Cell Neurosci. 2014 Nov 4 (Invited Review)

C) Originalarbeiten als Koautorin

1. CaV2.1 channel mutations causing familial hemiplegic migraine type 1 increase the susceptibility for cortical spreading depolarizations and seizures and worsen outcome after experimental traumatic brain injury.
Terpolilli NA, Dolp R, Waehner K, **Schwarzmaier SM**, Rumbler E, Todorov B, Ferrari MD, van den Maagdenberg AMJM, Plesnila N.
Elife. 2022 Mar
2. Plasminogen activator inhibitor-1 augments damage by impairing fibrinolysis after traumatic brain injury.
Griemert EV, **Schwarzmaier SM**, Hummel R, Gölz C, Yang D, Neuhaus W, Burek M, Förster CY, Petkovic I, Trabold R, Plesnila N, Engelhard K, Schäfer MK, Thal SC.
Ann Neurol. 2019 May
3. Microvasospasms After Experimental Subarachnoid Hemorrhage Do Not Depend on Endothelin A Receptors.
Liu H, Dienel A, Schöller K, **Schwarzmaier SM**, Nehr Korn K, Plesnila N, Terpolilli NA.
Stroke. 2018 Mar
4. Acute changes in neurovascular reactivity after subarachnoid hemorrhage in vivo.
Balbi M, Koide M, **Schwarzmaier SM**, Wellman GC, Plesnila N.
J Cereb Blood Flow Metab. 2017 Jan
5. Temporal Profile of MicroRNA Expression in Contused Cortex after Traumatic Brain Injury in Mice.
Meissner L, Gallozzi M, Balbi M, **Schwarzmaier S**, Tiedt S, Terpolilli NA, Plesnila N.
J Neurotrauma. 2016 Apr 15
6. Applying the retro-enantio approach to obtain a peptide capable of overcoming the blood-brain barrier.
Prades R, Oller-Salvia B, **Schwarzmaier SM**, Selva J, Moros M, Balbi M, Grazú V, de La Fuente JM, Egea G, Plesnila N, Teixidó M, Giralt E.
Angew Chem Int Ed Engl. 2015 Mar 23
7. The delayed addition of human mesenchymal stem cells to pre-formed endothelial cell networks results in functional vascularization of a collagen-glycosaminoglycan scaffold in vivo.
McFadden TM, Duffy GP, Allen AB, Stevens HY, **Schwarzmaier SM**, Plesnila N, Murphy JM, Barry FP, Guldberg RE, O'Brien FJ.
Acta Biomater. 2013 Dec
8. Inhalation of nitric oxide prevents ischemic brain damage in experimental stroke by selective dilatation of collateral arterioles.
Terpolilli NA, Kim SW, Thal SC, Kataoka H, Zeisig V, Nitzsche B, Klaesner B, Zhu C, **Schwarzmaier S**, Meissner L, Mamrak U, Engel DC, Drzezga A, Patel RP, Blomgren K, Barthel H, Boltze J, Kuebler WM, Plesnila N.
Circ Res. 2012 Mar 2

8. Literaturverzeichnis

- Badaut, J. and Plesnila, N. 2017. 'Brain edema. From Molecular Mechanisms to Clinical Practice.', *Elsevier*.
- Bao, F., S. R. Shultz, J. D. Hepburn, V. Omana, L. C. Weaver, D. P. Cain, and A. Brown. 2012. 'A CD11d monoclonal antibody treatment reduces tissue injury and improves neurological outcome after fluid percussion brain injury in rats', *J Neurotrauma*, 29: 2375-92.
- Berndt, M.C., C.M. Ward, Luca M. De, D.A. Facey, P.A. Castaldi, S.J. Harris, and R.K. Andrews. 1995. 'The molecular mechanism of platelet adhesion', *Aust.N.Z.J.Med.*, 25: 822-30.
- Bouma, G.J., J.P. Muizelaar, S.C. Choi, P.G. Newlon, and H.F. Young. 1991. 'Cerebral circulation and metabolism after severe traumatic brain injury: the elusive role of ischemia', *J Neurosurg*, 75: 685-93.
- Bourgeois-Tardif, S., L. De Beaumont, J. C. Rivera, S. Chemtob, and A. G. Weil. 2021. 'Role of innate inflammation in traumatic brain injury', *Neurol Sci*, 42: 1287-99.
- Bramlett, H.M., and W.D. Dietrich. 2004. 'Pathophysiology of cerebral ischemia and brain trauma: similarities and differences', *J.Cereb.Blood Flow Metab*, 24: 133-50.
- Bruce, E. D., S. Konda, D. D. Dean, E. W. Wang, J. H. Huang, and D. M. Little. 2015. 'Neuroimaging and traumatic brain injury: State of the field and voids in translational knowledge', *Mol Cell Neurosci*, 66: 103-13.
- Bryan, R.M., Jr., L. Cherian, and C. Robertson. 1995. 'Regional cerebral blood flow after controlled cortical impact injury in rats', *Anesth Analg*, 80: 687-95.
- Bullock, R., W.L. Maxwell, D.I. Graham, G.M. Teasdale, and J.H. Adams. 1991. 'Glial swelling following human cerebral contusion: an ultrastructural study', *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 54: 427-34.
- Cherian, L., R. Hlatky, and C.S. Robertson. 2004. 'Nitric oxide in traumatic brain injury', *Brain Pathol.*, 14: 195-201.
- Dewitt, D.S., L.W. Jenkins, E.P. Wei, H. Lutz, D.P. Becker, and H.A. Kontos. 1986. 'Effects of fluid-percussion brain injury on regional cerebral blood flow and pial arteriolar diameter', *J Neurosurg*, 64: 787-94.
- Dietrich, W.D., O. Alonso, R. Busto, R. Prado, W. Zhao, M.K. Dewanjee, and M.D. Ginsberg. 1998. 'Posttraumatic cerebral ischemia after fluid percussion brain injury: an autoradiographic and histopathological study in rats', *Neurosurgery*, 43: 585-93.
- Dietrich, W.D., O. Alonso, and M. Halley. 1994. 'Early microvascular and neuronal consequences of traumatic brain injury: a light and electron microscopic study in rats', *J.Neurotrauma.*, 11: 289-301.
- Dixon, C.E., G.L. Clifton, J.W. Lighthall, A.A. Yaghmai, and R.L. Hayes. 1991. 'A controlled cortical impact model of traumatic brain injury in the rat', *J.Neurosci.Methods*, 39: 253-62.
- Donkin, J. J., and R. Vink. 2010. 'Mechanisms of cerebral edema in traumatic brain injury: therapeutic developments', *Curr Opin Neurol*, 23: 293-9.
- Duering, M., S. Finsterwalder, E. Baykara, A. M. Tuladhar, B. Gesierich, M. J. Konieczny, R. Malik, N. Franzmeier, M. Ewers, E. Jouvent, G. J. Biessels, R. Schmidt, F. E. de Leeuw, O. Pasternak, and M. Dichgans. 2018. 'Free water determines diffusion alterations and clinical status in cerebral small vessel disease', *Alzheimers Dement*, 14: 764-74.
- Engel, D. C., G. Mies, N. A. Terpolilli, R. Trabold, A. Loch, C. I. De Zeeuw, J. T. Weber, A. I. Maas, and N. Plesnila. 2008. 'Changes of cerebral blood flow during the secondary expansion of a cortical contusion assessed by ¹⁴C-iodoantipyrine autoradiography in mice using a non-invasive protocol', *J Neurotrauma*, 25: 739-53.
- Faraci, F.M., and J.E. Brian, Jr. 1994. 'Nitric oxide and the cerebral circulation', *Stroke*, 25: 692-703.
- Fournier, M. L., T. Clement, J. Aussudre, N. Plesnila, A. Obenaus, and J. Badaut. 2021. 'Contusion Rodent Model of Traumatic Brain Injury: Controlled Cortical Impact', *Methods Mol Biol*, 2193: 49-65.
- Goeppert-Mayer, Maria. 1931. 'Über Elementarakte mit zwei Quantensprüngen', *Annalen der Physik*, 9. Jahrgang, S. 273–94

- Grande, P. O., and B. Romner. 2012. 'Osmotherapy in brain edema: a questionable therapy', *J Neurosurg Anesthesiol*, 24: 407-12.
- Griemert, E. V., S. M. Schwarzmaier, R. Hummel, C. Golz, D. Yang, W. Neuhaus, M. Burek, C. Y. Forster, I. Petkovic, R. Trabold, N. Plesnila, K. Engelhard, M. K. Schafer, and S. C. Thal. 2019. 'Plasminogen activator inhibitor-1 augments damage by impairing fibrinolysis after traumatic brain injury', *Ann Neurol*, 85: 667-80.
- Hall, E.D., Y.D. Bryant, W. Cho, and P.G. Sullivan. 2008. 'Evolution of post-traumatic neurodegeneration after controlled cortical impact traumatic brain injury in mice and rats as assessed by the de Olmos silver and fluorojade staining methods', *J.Neurotrauma*, 25: 235-47.
- Hartl, R., M. Medary, M. Ruge, K.E. Arfors, and J. Ghajar. 1997a. 'Blood-brain barrier breakdown occurs early after traumatic brain injury and is not related to white blood cell adherence', *Acta Neurochir.Suppl*, 70: 240-42.
- Hartl, R., M.B. Medary, M. Ruge, K.E. Arfors, F. Ghahremani, and J. Ghajar. 1997. 'Hypertonic/hyperoncotic saline attenuates microcirculatory disturbances after traumatic brain injury', *J.Trauma.*, 42: S41-S47.
- Hartl, R., M.B. Medary, M. Ruge, K.E. Arfors, and J. Ghajar. 1997b. 'Early white blood cell dynamics after traumatic brain injury: effects on the cerebral microcirculation', *J.Cereb.Blood Flow Metab.*, 17: 1210-20.
- Helmchen, F., and W. Denk. 2005. 'Deep tissue two-photon microscopy', *Nat Methods*, 2: 932-40.
- Holmin, S., T. Mathiesen, J. Shetye, and P. Biberfeld. 1995. 'Intracerebral inflammatory response to experimental brain contusion', *Acta Neurochir.(Wien.)*, 132: 110-19.
- Hu, Y., B. Seker, C. Exner, J. Zhang, N. Plesnila, and S. M. Schwarzmaier. 2021. 'Longitudinal Characterization of Blood-Brain Barrier Permeability after Experimental Traumatic Brain Injury by In Vivo 2-Photon Microscopy', *J Neurotrauma*, 38: 399-410.
- Jassam, Y. N., S. Izzy, M. Whalen, D. B. McGavern, and J. El Khoury. 2017. 'Neuroimmunology of Traumatic Brain Injury: Time for a Paradigm Shift', *Neuron*, 95: 1246-65.
- Jha, R. M., P. M. Kochanek, and J. M. Simard. 2019. 'Pathophysiology and treatment of cerebral edema in traumatic brain injury', *Neuropharmacology*, 145: 230-46.
- Kempiski, O. 2001. 'Cerebral edema', *Semin Nephrol*, 21: 303-7.
- Kenne, E., A. Erlandsson, L. Lindbom, L. Hillered, and F. Clausen. 2012. 'Neutrophil depletion reduces edema formation and tissue loss following traumatic brain injury in mice', *J Neuroinflammation*, 9: 17.
- Kim, H., M. Kim, S. K. Im, and S. Fang. 2018. 'Mouse Cre-LoxP system: general principles to determine tissue-specific roles of target genes', *Lab Anim Res*, 34: 147-59.
- Klatzo, I. 1967. 'Presidential address. Neuropathological aspects of brain edema', *J Neuropathol Exp Neurol*, 26: 1-14.
- Kochanek, P.M., D.W. Marion, W. Zhang, J.K. Schiding, M. White, A.M. Palmer, R.S. Clark, M.E. O'Malley, S.D. Styren, C. Ho, and et al. 1995. 'Severe controlled cortical impact in rats: assessment of cerebral edema, blood flow, and contusion volume', *J Neurotrauma*, 12: 1015-25.
- Lighthall, J.W., C.E. Dixon, and T.E. Anderson. 1989. 'Experimental models of brain injury', *J.Neurotrauma*, 6: 83-97.
- Lu, D., A. Mahmood, A. Goussev, C. Qu, Z.G. Zhang, and M. Chopp. 2004. 'Delayed thrombosis after traumatic brain injury in rats', *J.Neurotrauma*, 21: 1756-66.
- Lukaszewicz, A. C., B. Soyer, and D. Payen. 2011. 'Water, water, everywhere: sodium and water balance and the injured brain', *Curr Opin Anaesthesiol*, 24: 138-43.
- Maas, A. I., E. W. Steyerberg, G. D. Murray, R. Bullock, A. Baethmann, L. F. Marshall, and G. M. Teasdale. 1999. 'Why have recent trials of neuroprotective agents in head injury failed to show convincing efficacy? A pragmatic analysis and theoretical considerations', *Neurosurgery*, 44: 1286-98.
- Maas, A.I., N. Stocchetti, and R. Bullock. 2008. 'Moderate and severe traumatic brain injury in adults', *Lancet Neurol.*, 7: 728-41.

- Maegele, M., H. Schochl, T. Menovsky, H. Marechal, N. Marklund, A. Buki, and S. Stanworth. 2017. 'Coagulopathy and haemorrhagic progression in traumatic brain injury: advances in mechanisms, diagnosis, and management', *Lancet Neurol*, 16: 630-47.
- Mao, X., N. A. Terpolilli, A. Wehn, S. Cheng, F. Hellal, B. Liu, B. Seker, and N. Plesnila. 2020. 'Progressive Histopathological Damage Occurring Up to One Year after Experimental Traumatic Brain Injury Is Associated with Cognitive Decline and Depression-Like Behavior', *J Neurotrauma*, 37: 1331-41.
- Marklund, N., B. M. Bellander, A. K. Godbolt, H. Levin, P. McCrory, and E. P. Thelin. 2019. 'Treatments and rehabilitation in the acute and chronic state of traumatic brain injury', *J Intern Med*, 285: 608-23.
- Marmarou, A. 2003. 'Pathophysiology of traumatic brain edema: current concepts', *Acta Neurochir Suppl*, 86: 7-10.
- Morganti-Kossmann, M. C., E. Yan, and N. Bye. 2010. 'Animal models of traumatic brain injury: is there an optimal model to reproduce human brain injury in the laboratory?', *Injury*, 41 Suppl 1: S10-3.
- Morganti-Kossmann, M.C., M. Rancan, P.F. Stahel, and T. Kossmann. 2002. 'Inflammatory response in acute traumatic brain injury: a double-edged sword', *Curr.Opin.Crit Care*, 8: 101-05.
- Pasternak, O., N. Sochen, Y. Gur, N. Intrator, and Y. Assaf. 2009. 'Free water elimination and mapping from diffusion MRI', *Magn Reson Med*, 62: 717-30.
- Peeters, W., R. van den Brande, S. Polinder, A. Brazinova, E. W. Steyerberg, H. F. Lingsma, and A. I. Maas. 2015. 'Epidemiology of traumatic brain injury in Europe', *Acta Neurochir (Wien)*, 157: 1683-96.
- Plesnila, N. 2007. 'Decompression craniectomy after traumatic brain injury: recent experimental results', *Prog Brain Res*, 161: 393-400.
- Plesnila, N.. 2016. 'The immune system in traumatic brain injury', *Curr Opin Pharmacol*, 26: 110-7.
- Plesnila, N., D. Friedrich, J. Eriskat, A. Baethmann, and M. Stoffel. 2003. 'Relative cerebral blood flow during the secondary expansion of a cortical lesion in rats', *Neurosci Lett*, 345: 85-8.
- Plesnila, N., Kempfski, O. 2017. 'Mechanisms of Cell-Volume Regulation in the Central Nervous System.', *Brain Edema*: 151-62.
- Reyes-Aldasoro, C. C., I. Wilson, V. E. Prise, P. R. Barber, M. Ameer-Beg, B. Vojnovic, V. J. Cunningham, and G. M. Tozer. 2008. 'Estimation of apparent tumor vascular permeability from multiphoton fluorescence microscopic images of P22 rat sarcomas in vivo', *Microcirculation*, 15: 65-79.
- Rivera, J., M.L. Lozano, L. Navarro-Nunez, and V. Vicente. 2009. 'Platelet receptors and signaling in the dynamics of thrombus formation', *Haematologica*, 94: 700-11.
- Robertson, C.S., C.F. Contant, Z.L. Gokaslan, R.K. Narayan, and R.G. Grossman. 1992. 'Cerebral blood flow, arteriovenous oxygen difference, and outcome in head injured patients', *J.Neurol.Neurosurg.Psychiatry*, 55: 594-603.
- Sahuquillo, J., M.A. Poca, and S. Amoros. 2001. 'Current aspects of pathophysiology and cell dysfunction after severe head injury', *Curr.Pharm.Des*, 7: 1475-503.
- Schroder, M.L., J.P. Muizelaar, M.R. Bullock, J.B. Salvant, and J.T. Povlishock. 1995. 'Focal ischemia due to traumatic contusions documented by stable xenon-CT and ultrastructural studies', *J Neurosurg*, 82: 966-71.
- Schwarzmaier, S. M., C. de Chaumont, M. Balbi, N. A. Terpolilli, C. Kleinschnitz, A. Gruber, and N. Plesnila. 2016. 'The Formation of Microthrombi in Parenchymal Microvessels after Traumatic Brain Injury Is Independent of Coagulation Factor XI', *J Neurotrauma*, 33: 1634-44.
- Schwarzmaier, S. M., M. Gallozzi, and N. Plesnila. 2015. 'Identification of the Vascular Source of Vasogenic Brain Edema following Traumatic Brain Injury Using In Vivo 2-Photon Microscopy in Mice', *J Neurotrauma*, 32: 990-1000.
- Schwarzmaier, S. M., S. W. Kim, R. Trabold, and N. Plesnila. 2010. 'Temporal profile of thrombogenesis in the cerebral microcirculation after traumatic brain injury in mice', *J Neurotrauma*, 27: 121-30.

- Schwarzmaier, S. M., and N. Plesnila. 2014. 'Contributions of the immune system to the pathophysiology of traumatic brain injury - evidence by intravital microscopy', *Front Cell Neurosci*, 8: 358.
- Schwarzmaier, S. M., N. A. Terpolilli, A. Dienel, M. Gallozzi, R. Schinzel, F. Tegtmeier, and N. Plesnila. 2015. 'Endothelial nitric oxide synthase mediates arteriolar vasodilatation after traumatic brain injury in mice', *J Neurotrauma*, 32: 731-8.
- Schwarzmaier, S. M., R. Zimmermann, N. B. McGarry, R. Trabold, S. W. Kim, and N. Plesnila. 2013. 'In vivo temporal and spatial profile of leukocyte adhesion and migration after experimental traumatic brain injury in mice', *J Neuroinflammation*, 10: 32.
- Stein, S.C., X.H. Chen, G.P. Sinson, and D.H. Smith. 2002. 'Intravascular coagulation: a major secondary insult in nonfatal traumatic brain injury', *J.Neurosurg.*, 97: 1373-77.
- Stein, S.C., D.I. Graham, X.H. Chen, and D.H. Smith. 2004. 'Association between intravascular microthrombosis and cerebral ischemia in traumatic brain injury', *Neurosurgery.*, 54: 687-91.
- Stein, S.C., and D.H. Smith. 2004. 'Coagulopathy in traumatic brain injury', *Neurocrit.Care*, 1: 479-88.
- Steyerberg, E. W., E. Wieggers, C. Sewalt, A. Buki, G. Citerio, V. De Keyser, A. Ercole, K. Kunzmann, L. Lanyon, F. Lecky, H. Lingsma, G. Manley, D. Nelson, W. Peul, N. Stocchetti, N. von Steinbuchel, T. Vande Vyvere, J. Verheyden, L. Wilson, A. I. R. Maas, D. K. Menon, Center-Tbi Participants, and Investigators. 2019. 'Case-mix, care pathways, and outcomes in patients with traumatic brain injury in CENTER-TBI: a European prospective, multicentre, longitudinal, cohort study', *Lancet Neurol*, 18: 923-34.
- Stocchetti, N., and A. I. Maas. 2014. 'Traumatic intracranial hypertension', *N Engl J Med*, 370: 2121-30.
- Terpolilli, N. A., K. Zweckberger, R. Trabold, L. Schilling, R. Schinzel, F. Tegtmeier, and N. Plesnila. 2009. 'The novel nitric oxide synthase inhibitor 4-amino-tetrahydro-L-biopterine prevents brain edema formation and intracranial hypertension following traumatic brain injury in mice', *J Neurotrauma*, 26: 1963-75.
- Thal, S. C., and N. Plesnila. 2007. 'Non-invasive intraoperative monitoring of blood pressure and arterial pCO₂ during surgical anesthesia in mice', *J Neurosci Methods*, 159: 261-7.
- Unterberg, A.W., J. Stover, B. Kress, and K.L. Kiening. 2004. 'Edema and brain trauma', *Neuroscience*, 129: 1021-9.
- Utagawa, A., H.M. Bramlett, L. Daniels, G. Lotocki, G.A. Dekaban, L.C. Weaver, and W.D. Dietrich. 2008. 'Transient blockage of the CD11d/CD18 integrin reduces contusion volume and macrophage infiltration after traumatic brain injury in rats', *Brain Res.*, 1207: 155-63.
- Whalen, M.J., T.M. Carlos, C.E. Dixon, J.K. Schiding, R.S. Clark, E. Baum, H.Q. Yan, D.W. Marion, and P.M. Kochanek. 1999. 'Effect of traumatic brain injury in mice deficient in intercellular adhesion molecule-1: assessment of histopathologic and functional outcome', *J.Neurotrauma*, 16: 299-309.
- Whalen, M.J., T.M. Carlos, P.M. Kochanek, and S. Heineman. 1998. 'Blood-brain barrier permeability, neutrophil accumulation and vascular adhesion molecule expression after controlled cortical impact in rats: a preliminary study', *Acta Neurochir.Suppl*, 71: 212-14.
- Zweckberger, K., C. Eros, R. Zimmermann, S. W. Kim, D. Engel, and N. Plesnila. 2006. 'Effect of early and delayed decompressive craniectomy on secondary brain damage after controlled cortical impact in mice', *J Neurotrauma*, 23: 1083-93.

9. Publikationen der kumulativen Habilitationsleistung

- 9.1. Temporal profile of thrombogenesis in the cerebral microcirculation after traumatic brain injury in mice. Schwarzmaier SM, Kim SW, Trabold R, Plesnila N., J Neurotrauma. 2010
- 9.2. In vivo temporal and spatial profile of leukocyte adhesion and migration after experimental traumatic brain injury in mice. Schwarzmaier SM, Zimmermann R, McGarry NB, Trabold R, Kim SW, Plesnila N. J Neuroinflammation. 2013
- 9.3. Endothelial nitric oxide synthase mediates arteriolar vasodilatation after traumatic brain injury in mice. Schwarzmaier SM, Terpolilli NA, Dienel A, Gallozzi M, Schinzel R, Tegtmeier F, Plesnila N. J Neurotrauma. 2015
- 9.4. Identification of the Vascular Source of Vasogenic Brain Edema following Traumatic Brain Injury Using In Vivo 2-Photon Microscopy in Mice. Schwarzmaier SM, Gallozzi M, Plesnila N. J Neurotrauma. 2015
- 9.5. The Formation of Microthrombi in Parenchymal Microvessels after Traumatic Brain Injury Is Independent of Coagulation Factor XI. Schwarzmaier SM, de Chaumont C, Balbi M, Terpolilli NA, Kleinschnitz C, Gruber A, Plesnila N. J Neurotrauma. 2016
- 9.6. Longitudinal Characterization of Blood-Brain Barrier Permeability after Experimental Traumatic Brain Injury by In Vivo 2-Photon Microscopy. Hu Y, Seker B, Exner C, Zhang J, Plesnila N, Schwarzmaier SM. J Neurotrauma. 2021
- 9.7. Plasminogen activator inhibitor-1 augments damage by impairing fibrinolysis after traumatic brain injury. Griemert EV, Schwarzmaier SM, Hummel R, Götz C, Yang D, Neuhaus W, Burek M, Förster CY, Petkovic I, Trabold R, Plesnila N, Engelhard K, Schäfer MK, Thal SC. Ann Neurol. 2019