

Reflections on the causes and treatment of multiple sclerosis

Rozważania na temat przyczyn powstawania stwardnienia rozsianego i leczenia

Jacek Stankowski, Jerzy Zwoliński, Wojciech Witkiewicz

Department of Vascular Surgery, Provincial Specialist Hospital Wrocław, Poland (Oddział Chirurgii Naczyniowej, Wojewódzki Szpital Specjalistyczny we Wrocławiu)

Abstract

Sclerosis multiplex (SM) is considered as a immunologic disease, which pathogenesis still remains unknown — it is therefore difficult to choose the optimal method of treatment. The aim of this review is to analyze the vascular theory of pathogenesis of SM and possibilities of new therapeutic options of the disease. Surprising is the number of common elements both in the vascular theory of SM, and the effects of subarachnoid haemorrhage. Additionally, in light of current research studies, it appears that responsible for the neurological deterioration after SAH is not just reactive arterial narrowing, but rather the local inflammatory response generated by the extravasated blood. It seems to be a logical proposal to use the similar treatment in the acute MS relapse as the nimodipine treatment for acute neurological deterioration after SAH.

Key words: sclerosis multiplex, nimodipine, subarachnoid hemorrhage, demyelination, inflammation

Streszczenie

Stwardnienie rozsiane jest uważane za chorobę demielinizacyjną o podłożu immunologicznym, niejasna pozostaje jednak nadal jego patogeneza, zatem wybór optymalnej metody postępowania jest trudny. Celem niniejszej pracy jest analiza teorii naczyniowej patogenezy SM oraz ewentualnych nowych opcji terapeutycznych. Zaskakująca jest liczba elementów wspólnych dla teorii naczyniowej SM, jak również efektów uszkodzenia naczyń mózgowych w przebiegu krwawienia podpajęczynówkowego. Dodatkowo, w odniesieniu do aktualnych badań za zły stan kliniczny chorych po SAH wydaje się odpowiadać nie tyle reaktywne zwężenie naczyń tętniczych, co miejscowa reakcja zapalna powstająca w wyniku działania wynaczynionej krwi. Logiczną wydaje się zatem propozycja zastosowania m.in. nimodypiny w ostrych rzutach SM leczenia podobnego jak terapia ostrego pogorszenia stanu neurologicznego w SAH.

Słowa kluczowe: stwardnienie rozsiane, nimodypina, krwawienie podpajęczynówkowe, demielinizacja, zapalenie

Acta Angiol 2012; 18, 3: 118–123

Sclerosis multiplex (SM) is considered a demyelinating and immune-mediated disease. Symptoms of the disease are caused by axonal conduction disorder due to neuronal demyelination. Typical feature of this dis-

Stwardnienie rozsiane jest uważane za chorobę demielinizacyjną o podłożu immunologicznym. Objawy choroby tłumaczy się zaburzeniem przewodzenia aksonalnego poprzez demielinizację neuronów. Typo-

Address for correspondence:

dr n. med. Jacek Stankowski
Finkenweg 1, 54293 Trier
tel.: 0049 173 63 62 707
e-mail: jacek_stankowski@poczta.fm

ease are alternating remission periods resulting from axon remyelination and relapse periods associated with an intensification of local inflammation and further demyelination [1]. The MRI indicator of disease as well as a diagnostic criterion is the presence of plaques, comprising active and old, inactive lesions [2]. As the reason for local inflammatory response development is unclear, the vascular theory of SM pathogenesis seems quite interesting. The authors of numerous works have shown that the formation of typical SM changes is caused by venous stasis and transudation of blood cells based on a mechanism similar to that of venous ulcer development in peripheral venous disease. This is also confirmed by microscope images of those two types of lesions [3].

It was also found that SM is associated with the narrowing of veins draining the central nervous system (CNS), and based on that finding an alternative SM therapy was proposed involving angioplasty of these vessels with the aim to improve the CNS venous outflow. The results published so far seem to be inconclusive, some authors claim that angioplasty of these vessels improves the condition of 60–80% of patients [4, 5] while others report that the improvement is visible only during the first three months, with no long-term effects on the patient's neurological state [6]. However, it should be remembered that all studies conducted so far have been exclusively pilot studies involving small groups of patients.

Sclerosis multiplex and the pathophysiology thereof seems interesting when considered from the point of view of another condition associated with the cerebral vessels and the presence of free blood, namely subarachnoid haemorrhage. The rate of subarachnoid haemorrhage (SAH) is 6–8 per 100 000 cases [7]. The most common cause of subarachnoid haemorrhage is craniocerebral trauma, and another and the most common cause of non-traumatic SAH, accounting for up to 80% of cases, is rupture of a cerebral aneurysm. The severity of the clinical status is assessed according to the Hunt and Hess scale proposed in 1968, and it correlates with the amount of extravasated blood, which is in turn scored according to the Fisher scale: the greater the amount of extravasated blood, the worse the patient's condition and the further the course of the disease [9–11].

An interesting issue is the phenomenon called vasospasm. It occurs mainly during SAH caused by a ruptured aneurysm, it is characteristic for 30–50% of cases. It is a typical deterioration of a patient's condition observed 3–14 days after SAH, considered to be a result of the cerebral vessels' response to the presence of blood in the subarachnoid space [12]. So far the highest expectations are connected with two drugs used for vasospasm treatment: nimodipine and clazosentan. The first one

we są okresy remisji będących wynikiem remielinizacji aksonów oraz nawrotów związanych z nasileniem miejscowego stanu zapalnego oraz dalszą demielinizacją [1]. W obrazie rezonansu magnetycznego (MR) wyznacznikiem choroby, jak również kryterium diagnostycznym jest obecność blaszek (*plaque*), dzielących się na aktywne oraz stare, nieaktywne zmiany [2]. Ponieważ powód powstawania miejscowej reakcji zapalnej jest niejasny, interesująca wydaje się teoria naczyniowej patogenezy stwardnienia rozsianego. Autorzy licznych prac dowodzą, że za powstawanie zmian typowych dla stwardnienia rozsianego (SM, *sclerosis multiplex*) odpowiadają zastój żylny i przesiłek elementów morfotycznych krwi na bazie mechanizmu podobnego do mechanizmu powstawania owrzodzeń żylnych w chorobie żył obwodowych. Dowodzi tego również obraz mikroskopowy obu zmian [3].

Dowiedziano także istniejącego w SM zwężenia naczyń żylnych odprowadzających krew z OUN; na tej podstawie zaproponowano alternatywę dla dotychczasowych terapii SM w postaci plastyki tych naczyń, w celu poprawy odpływu żylnego z OUN. Wyniki dotychczasowych publikacji wydają się niejasne, część z nich dowodzi, że angioplastyka tych naczyń poprawia stan 60–80% chorych [4, 5], według innych poprawa jest widoczna jedynie w ciągu pierwszych 3 miesięcy, bez długofalowego wpływu na stan neurologiczny chorych [6]. Należy jednak pamiętać, że wszystkie dotychczasowe badania miały charakter wyłącznie pilotażowy i były prowadzone w małej grupie chorych.

Interesujące wydaje się spojrzenie na SM oraz jego patofizjologię z perspektywy innej choroby związanej z naczyniami mózgowymi oraz z obecnością wolnej krwi poza nimi, czyli krwawienia podpajęczynówkowego, które (SAH, *subarachnoid hemorrhage*) występuje w 6–8 przypadków na 100 000 osób [7, 8]. Najczęstszą jego przyczyną krwawienia jest uraz czaszkowo-mózgowy, natomiast kolejną oraz najczęstszą przyczyną nieurazowego SAH, obejmującą do 80% przypadków, jest pęknięcie tętniaka mózgu. Ciężkość stanu klinicznego ocenia się w zaproponowanej w 1968 roku skali Hunt Hessa; koreluje ona z ilością wynaczynionej krwi, co jest z kolei oceniane w skali Fishera: im większa ilość wynaczynionej krwi, tym gorszy stan chorego oraz dalszy przebieg choroby [9–11].

Interesującym zagadnieniem jest zjawisko zwane skurczem naczyniowym. Występuje głównie w przypadku SAH pochodzącego z pękniętego tętniaka, obejmuje 30–50% przypadków. Jest to występujące zwykle między 3. a 14. dniem po SAH pogorszenie stanu chorego, uważane za wynik reakcji naczyń mózgowych na obecność krwi w przestrzeni podpajęczynówkowej [12]. Do tej pory największe nadzieje pokłada się w dwóch środkach

is a type III calcium channel blocker, while the second is an endothelin I receptor antagonist, preventing the vasospasm at a much earlier stage and in many other mechanisms — thus it should be a much more effective therapeutic agent. It has been proven that, despite a much better effect of clazosentan on the arterial vasospasm, nimodipine is still more effective in patients with SAH symptoms. Therefore, as nimodipine is more effective in reducing the vasospasm symptoms, and not so much in affecting the vasospasm itself, the question should be asked: what are the reasons for late symptoms in SAH patients other than vasospasm? Subarachnoid haemorrhage means primarily the direct contact between blood and nerve cells. The first thing to mention here is the haemoglobin and the neuronal apoptosis and oxidative stress induced by its presence. Other effects include NO free radicals scavenging, and the impact on gene expression [17–19]. In addition, a local inflammatory reaction develops, which was also demonstrated in animal models [20]. As mentioned before, haemoglobin also affects gene expression, especially the inflammatory response genes — it mainly causes overexpression of genes responsible for the stimulation of the inflammatory response, reduces the activity of the inflammatory reaction suppressor genes, and disturbs the intracellular calcium metabolism [21]. Another important mechanism is the expression of nitric oxide synthase — the higher it is, the lower the risk of vasospasm after SAH [22]. Therefore, NO seems important not only due to its effect on the vascular smooth muscle, but also for inhibiting the inflammatory reaction.

It should also be kept in mind that SAH involves blood extravasation with all its morphotic elements, and thus a local inflammatory reaction develops accompanied by the release of the inflammatory cytokine cascade, mainly interleukin-1 β , interleukin-6, TGF β 1, or CRP. In fact, it is the most likely reason for posthaemorrhagic hydrocephalus, based on a mechanism very similar to (MR) meningitis-induced inflammatory hydrocephalus [24].

The medical procedure of choice in the prevention and treatment of vasospasm is the gold standard of using nimodipine. However, the only known mechanism of nimodipine action is blocking the type III calcium channels — its other effects are uncertain, or unknown. On the other hand, the animal model demonstrated the same effectiveness of interthecal administration of NO donors, such as nitroglycerin [25]. Based on the above assumptions, the clinical improvement in patients with symptomatic vascular spasm seems to be due to multi-factorial effects of nitric oxide rather than due to blocking calcium channels and broadening of the spastic vessels.

w leczeniu skurczu naczyniowego: nimodypiny oraz klazosentanu. Pierwszy z nich jest antagonistą wapnia typu 3, drugi natomiast — antagonistą receptora endoteliny I, powstrzymującym zatem skurcz naczyniowy na dużo wcześniejszym etapie i w wielu innych mechanizmach — powinien być więc dużo lepszym środkiem terapeutycznym. Dowiedziono, że mimo znacznie lepszego wpływu klazosentanu na skurcz naczyń tętniczych nimodypina nadal wykazuje lepsze działanie na stan chorych z objawami SAH. Skoro zatem nimodypina oddziałuje korzystniej na objawy skurczu naczyniowego, mniej wpływając na sam skurcz, należy sobie zadać pytanie: co oprócz skurczu naczyń powoduje późne objawy u chorych po SAH? [13–16]. Krwawienie podpajęczynówkowe oznacza przede wszystkim obecność krwi mającej bezpośredni kontakt z komórkami nerwowymi. W pierwszej kolejności należy wspomnieć o samej hemoglobinie oraz indukowanych jej obecnością apoptozie neuronów i stresie oksydacyjnym. Inne efekty to m.in. zmiatanie wolnych rodników NO oraz wpływ na ekspresję genów [17–19]. Dodatkowo, powstaje miejscowa reakcja zapalna, co zostało dowiedzione również na modelu zwierzęcym [20]. Jak wspomniano, hemoglobina ma również wpływ na ekspresję genów, przede wszystkim związanych z reakcją zapalną — powoduje głównie nadekspresję genów odpowiedzialnych za stymulację reakcji zapalnej, obniżenie aktywności genów supresorowych reakcji zapalnej oraz wpływ na gospodarkę wapniem wewnątrzkomórkowym [21]. Kolejnym ważnym mechanizmem jest poziom ekspresji syntazy tlenu azotu — im jest on wyższy, tym mniejsze jest ryzyko skurczu naczyniowego po SAH [22]. Istotne zatem, oprócz wpływu na mięśnie gładkie naczyń, wydaje się również działanie NO hamujące reakcję zapalną [23].

Należy też pamiętać, że w SAH dochodzi do wynaczynienia pełnej krwi z jej wszystkimi elementami morfotycznymi, a w konsekwencji — do miejscowej reakcji zapalnej z uwolnieniem kaskady cytokin, głównie interleukiny-1 β , interleukiny-6, TGF- β 1 czy białka C-reaktywnego (CRP, *C-reactive protein*). W efekcie jest to najbardziej prawdopodobny powód pokrwotocznego wodogłowia, o mechanizmie bliźniaczym do mechanizmu odpowiedzialnego za powstawanie wodogłowia po przebyciu zapalenia opon mózgowo-rdzeniowych [24].

Postępowaniem medycznym z wyboru w profilaktyce oraz leczeniu skurczu naczyniowego przy zastosowaniu metody referencyjnej jest stosowanie nimodypiny. Jednak o mechanizmach działania tego leku wiadomo jedynie tyle, że jednym z nich jest blokowanie kanałów wapniowych typu 3 — pozostałe działania są niepewne bądź nieznanne. Z drugiej strony, w modelu zwierzęcym dowiedziono identycznej skuteczności podanych intra-

Coming back to the multiple sclerosis: if the primary mechanism responsible for the development of the disease is blood extravasation — as in the case of clinical SAH — we should consider the effect of nitric oxide donors penetrating the blood-brain barrier (e.g. nimodipine) in the course of multiple sclerosis, especially during its acute relapses, which, according to the vascular theory of SM and in light of the information discussed above, should correspond to episodes of symptomatic vasospasm induced by subarachnoid haemorrhage. It also seems that the above proposed treatment does not reject the thus far standard SM therapy — which is in fact based on the treatment of late persistent inflammation; administering NO donors could help at the early stage of the disease and prevent new relapses. Obviously one might wonder why the clinical course of SM does not correspond to the clinical course of SAH. The answer seems fairly simple: the Hunt and Hess clinical condition score for SAH is directly correlated with the Fisher scale. In other words, the symptoms are directly correlated with the amount of extravasated blood. On the other hand, the amount of extravasated blood in the SM is always significantly lower than during SAH. In addition, SAH, in contrast to SM relapses, usually constitutes a single episode, which seems to logically explain different symptoms of both diseases.

On the other hand, if the blood extravasation into the CNS can lead to chronic inflammation (over 4 weeks in an animal model) [20], we should also consider the reasonableness of the reverse situation — namely, the use of the existing standard immunomodulator therapy used in MS for the treatment of persistent neurological defects in SAH patients.

The authors are aware of the possible controversies arising from the publication of these proposals, and understand the objections against the MS vascular theory advocates, relating mainly to the omission of the first and second stage of the study. It should however be borne in mind that there are presently a number of inconsistent theories on the aetiology of multiple sclerosis — from autoimmune, through neurodegenerative, to the inflammation of viral aetiology (e.g. Epstein-Barr virus) and some other unknown environmental or even geographical factors [26]. However, none of these theories have been confirmed so far, and worse still, none of them is very consistent. Despite the lack of proven pathogenesis - and hence a predictable mechanism that could be disturbed - the patients are given such drugs as interferon beta-1a that causes serious side effects e.g. depressive disorders, suicide attempts, pancytopenia, seizures, congestive heart failure, cardiomyopathy, autoimmune disorders, liver failure, increased susceptibility

tekalnie donorów NO, jak np. nitrogliceryna [25]. Na tej podstawie bardziej prawdopodobne wydaje się, że za poprawę stanu klinicznego chorych z objawowym skurczem naczyniowym odpowiada nie tyle blokowanie kanałów wapniowych oraz poszerzanie skurczonych naczyń, co wieloczynnikowe działanie tlenu azotu.

Wracając do SM: skoro pierwotnym mechanizmem odpowiedzialnym za powstawanie choroby jest wynacznienie krwi, tak samo jak w przypadku objawów klinicznych SAH, należałoby się zastanowić, jaki wpływ miałyby zastosowanie donorów tlenu azotu przenikających barierę krew-mózg (jak np. nimodipina) na przebieg choroby, szczególnie w jej ostrych rzutach, które według teorii naczyniowej SM oraz w odniesieniu do przytoczonych powyżej informacji powinny odpowiadać epizodom objawowego skurczu naczyniowego po krwawieniu podpajęczynówkowym. Wydaje się również, że powyższa propozycja terapii nie zaprzecza dotychczasowemu klasycznemu leczeniu SM, które *de facto* jest leczeniem późnego przetrwałego stanu zapalnego, terapia donorami NO miałaby natomiast pomóc w leczeniu wczesnego okresu choroby oraz zapobieganiu jej nowym rzutom. Nasuwa się oczywiście pytanie, dlaczego objawy kliniczne SM nie są tożsame z objawami klinicznymi SAH. Odpowiedź wydaje się dość prosta — wynik w skali stanu klinicznego SAH Hunt Hess koreluje bezpośrednio ze skalą Fishera. Innymi słowy, stan kliniczny chorego wiąże się bezpośrednio z ilością wynacznionej krwi. Z drugiej strony, ilość krwi wynacznionej w SM jest zawsze zdecydowanie mniejsza niż w SAH. W dodatku, SAH jest w przeciwieństwie do rzutów SM zwykle pojedynczym epizodem choroby, co wydaje się logicznie tłumaczyć odmienne objawy obu chorób.

Z drugiej strony, skoro po wynacznieniu krwi do OUN może dojść do przewlekłego stanu zapalnego (trwającego ponad 4 tygodnie w modelu zwierzęcym) [20], należałoby rozważyć również sensowność odwrotnej sytuacji — mianowicie, zastosowania dotychczasowego klasycznego leczenia immunomodulacyjnego wykorzystywanego w SM w leczeniu przetrwałych ubytków neurologicznych u chorych po SAH.

Autorzy zdają sobie sprawę z możliwych kontrowersji wynikających z opublikowania powyższych wniosków, jak również rozumieją zarzuty względem propagatorów teorii naczyniowej SM, dotyczące głównie pominięcia badań fazy pierwszej oraz fazy drugiej. Należy jednak pamiętać, że obecnie proponowane są liczne niespójne teorie etiopatogenezy SM — od autoimmunologicznej, przez neurodegeneracyjną, do zapalenia o etiologii wirusowej (np. wirus Epsteina-Barr) oraz pewnych innych nieznanymi czynników środowiskowych czy wręcz

to infection, or endocrine disorders. Moreover, 75% of patients experience at least one of these side effects [26, 27]. The first and second stage studies seem to have a similar importance as treating septic fever with paracetamol — this comparison is quite accurate as in the case of multiple sclerosis the standard therapy boils down mainly to the partial control of one of the symptoms. Considering the above, the authors of this publication deem similar allegations as hardly comprehensible and insufficient to definitively reject this theory, especially if it provides good therapeutic outcomes, but obviously it is necessary to carry out proper clinical trials according to the principles of good clinical and research practice.

Acknowledgment

This publication is part of Project „WroVasc — Integrated Cardiovascular Centre”, co-financed by the European Regional Development Fund, within Innovative Economy Operational Program, 2007–2013 realized in Regional Specialist Hospital, Research and Development Center in Wrocław. “European Funds — for the development of innovative economy”.

References

1. Smith WI, McDonald WI (1999) The pathophysiology of multiple sclerosis: the mechanism underlying the production of symptoms and the natural history of the disease. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*; 354: 1649–1673.
2. Polman CH, Reingold SC, Banwell B et al (2011) Diagnostic Criteria for Multiple Sclerosis: 2010 Revisions to the McDonald Criteria. *Ann Neurol*; 69: 292–302.
3. Zamboni P (2006) The Big idea: iron-dependend inflammation in venous disease and proposed parallels in multiple sclerosis. *J. Royal Society Med*; 99: 589–593.
4. Zamboni P, Galeotti R, Weinstock-Guttman B, Kennedy C, Salvi F, Zidanov R (2012) Venous angioplasty in patients with multiple sclerosis: results of a pilot study. *J Vasc Endovasc Surg*; 43: 116–122.
5. Zamboni P, Galeotti R, Menegatti E et al (2009) A prospective open-label study of endovascular treatment of chronic cerebrospinal venous insufficiency. *J Vasc Surg*; 50: 1348–1358.
6. Kostecki J, Zaniewski M, Ziaja K et al (2011) An endovascular treatment of Chronic Cerebro-Spinal Venous Insufficiency in multiple sclerosis patients — 6 month follow-up results. *Neuro Endocrinol Lett*; 32: 557–562.
7. Broderick JP, Brott TG, Tomsick T et al (1993) Intracerebral hemorrhage more than twice as common as subarachnoid hemorrhage. *J Neurosurg*; 78: 188–191.
8. Linn FHH, Rinkel GJ, Algra A et al. (1996) Incidence of subarachnoid hemorrhage: role of region, year and CT scanning: a metaanalysis. *Stroke*; 27: 625–629.

uwarunkowanych geograficznie [26]. Żadna jednak z tych teorii nie znalazła do tej pory potwierdzenia, a co gorsza — żadna z nich nie jest całkowicie spójna. Mimo braku potwierdzonej patogenezы, a w konsekwencji przewidywalnego mechanizmu, który należałoby przerwać, u chorych stosuje się m.in. interferon beta 1a, powodujący jako objawy niepożądane m.in. zaburzenia depresyjne, próby samobójcze, pancytopenię, napady padaczkowe, zastoinową niewydolność serca, kardiomiopatię, zaburzenia autoimmunologiczne, niewydolność wątroby, zwiększoną podatność na zakażenia czy zaburzenia gospodarki hormonalnej. Co gorsza, co najmniej jeden spośród wymienionych objawów ubocznych występuje u 75% chorych [26, 27]. Badania fazy pierwszej oraz fazy drugiej mają prawdopodobnie znaczenie zbliżone jak w przypadku zastosowania paracetamolu w razie gorączki w posocznicy – porównanie jest o tyle trafione, że w przypadku SM i klasycznej terapii sprowadza się to głównie do częściowego kontrolowania jednego z objawów. Wobec tego, autorom powyższej publikacji podobne zarzuty wydają się mało zrozumiałe i niewystarczające, aby powyższą teorię definitywnie odrzucić, zwłaszcza jeżeli prowadzi ona do sukcesów terapeutycznych, co nie zwalnia oczywiście z konieczności przeprowadzenia poprawnych badań klinicznych odpowiadających zasadom dobrej praktyki klinicznej oraz naukowej.

Podziękowania

Publikacja jest częścią projektu “WroVasc — Zintegrowane Centrum Medycyny Sercowo-Naczyniowej”, współfinansowanego przez Europejski Fundusz Rozwoju Regionalnego, w ramach Programu Operacyjnego Innowacyjna Gospodarka na lata 2007–2013 realizowanego w Wojewódzkim Szpitalu Specjalistycznym we Wrocławiu, Ośrodka Badawczo-Rozwojowym.

9. Hunt WE, Hess RM (1968) Surgical risk as related to time of intervention in the repair of intracranial aneurysms. *J Neurosurg*; 28: 14–20.
10. Hunt WE, Meagher JN, Hess RM (1966) Intracranial aneurysm. A nine-year study. *Ohio State Medical Journal*; 62: 1168–1171.
11. Fisher C, Kistler J, Davis J (1980) Relation of cerebral vasospasm to subarachnoid hemorrhage visualized by computerized tomographic scanning. *Neurosurgery*; 6: 1–9.
12. Wani AA, Gupta V, Chugh M et al (2008) Transient Oculomotor Nerve Palsy After Subarachnoid Hemorrhage Due To Middle Cerebral Artery Aneurysm. *Internet Journal of Neurosurgery*; 5: DOI: 10.5580/24a8.

13. Pickard JD, Murray GD, Illingworth R et al (1989) Effect of oral nimodipine on cerebral infarction and outcome after subarachnoid haemorrhage: British aneurysm nimodipine trial. *BMJ*; 298: 636–642.
14. Barker FG 2nd, Ogilvy CS (1996) Efficacy of prophylactic nimodipine for delayed ischemic deficit after subarachnoid hemorrhage: a metaanalysis. *J Neurosurg*; 84: 405–414.
15. Vajkoczy P, Meyer B, Weidauer S and the other Study Participants (2005) Clazosentan (AXV-034343), a selective endothelin A receptor antagonist, in the prevention of cerebral vasospasm following severe aneurysmal subarachnoid hemorrhage: results of a randomized, double-blind, placebo-controlled, multicenter Phase IIa study. *J Neurosurg*; 103: 9–17.
16. Macdonald RL, Kassell NF, Mayer S et al; on behalf of the CONSCIOUS-1 Investigators (2008) Clazosentan to Overcome Neurological Ischemia and Infarction Occurring After Subarachnoid Hemorrhage (CONSCIOUS-1) Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Phase 2 Dose-Finding Trial. *Stroke*; 39: 3015–3021.
17. Wang X, Mori T, Sumii T, Lo EH (2002) Hemoglobin-induced cytotoxicity in rat cerebral cortical neurons: caspase activation and oxidative stress. *Stroke*; 33: 1882–1888.
18. Matz PG, Fujimura M, Chan PH (2000) Subarachnoid hemolysate produces DNA fragmentation in a pattern similar to apoptosis in mouse brain. *Brain Res*; 858: 312–319.
19. Matz PG, Lewen A, Chan PH (2001) Neuronal, but not microglial, accumulation of extravasated serum proteins after intracerebral hemolysate exposure is accompanied by cytochrome c release and DNA fragmentation. *J Cereb Blood Flow Metab*; 21: 921–928.
20. Xue M, Del Bigio MR (2000) Intracerebral injection of autologous whole blood in rats: time course of inflammation and cell death. *Neurosci Lett*; 283: 230–232.
21. Sasahara a, Kasuya H, Krischek B et al (2008) Gene expression in a canine basilar artery vasospasm model: a genome-wide network-based analysis. *Neurosurg Rev*; 31: 283–290.
22. Khurana VG, Sohni YR, Mangrum WI et al (2004) Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms predict susceptibility to aneurysmal subarachnoid hemorrhage and cerebral vasospasm. *J Cereb Blood Flow Metab*; 24: 291–297.
23. Granger DN, Kubes P (1996) Nitric oxide as antiinflammatory agent. *Methods in Enzymology*; 269: 434–442.
24. Takizawa T, Tada T, Kitazawa K, Tanaka Y, Hongo K, Kameko M, Uemura KI (2001) Inflammatory cytokine cascade released by leukocytes in cerebrospinal fluid after subarachnoid hemorrhage. *Neurol Res*; 23: 724–730.
25. Marbacher S, Neuschmelting V, Graupner T, Jakob SM, Fandino J (2008) Prevention of delayed cerebral vasospasm by continuous intrathecal infusion of glyceroltrinitrate and nimodipine in the rabbit model in vivo. *Intensive Care Medicine*; 34: 932–938.
26. Rowland LP, Pedley TA (2010). *Merritt's Neurology*, 12th ed.: 903–918.
27. Jongen PJ, Sindic Ch, Sanders E et al, and the Functional composite and quality of Life in Avonex-treated Relapsing multiple sclerosis patients (FLAIR) Study Group (2011); vol. 6, issue 10.