

Aus der Neurochirurgischen Klinik und Poliklinik  
Universitätsklinikum Würzburg  
Direktor: Professor Dr. med. R.-I. Ernestus

**Experimentelle Subarachnoidalblutung bei Ratten:  
Methylprednisolon und Minozyklin zur Behandlung der „Early Brain Injury“**

Inaugural- Dissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde der  
Medizinischen Fakultät  
der  
Julius- Maximilians- Universität Würzburg  
vorgelegt von  
Georg Dimitris Vadokas  
aus Göttingen

Würzburg, September 2019



**Referent:** Prof. Dr. med. Thomas Westermaier  
**Korreferentin:** Prof. Dr. med. habil. rer. nat. Carmen Villmann  
**Dekan:** Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 25.06.2020

Der Promovend ist Arzt.

# Inhaltsverzeichnis

A. Einleitung.....	1
B. Grundlagen.....	2
1 Die Subarachnoidalblutung (SAB).....	2
1.1 Definition und Epidemiologie .....	2
1.2 Ätiologie .....	2
1.3 Pathogenese .....	4
1.4 Klinik und Klassifikation .....	5
1.5 Diagnostik.....	6
1.6 Therapie .....	8
1.7 Stand der Wissenschaft – die „Early brain injury“ .....	9
2 Methylprednisolon.....	11
3 Minozyklin .....	13
C. Fragestellung.....	15
D. Methoden .....	16
1. Versuchstiere .....	16
2. Gewichtskontrollen.....	16
3. Narkose und Beatmung .....	17
4. Temperaturkontrolle .....	17
5. Blutdruckmessung und Blutgasanalyse .....	17
6. Messung des Hirndrucks und des zerebralen Blutflusses.....	19
7. Auslösung der SAB (endovaskuläres Perforationsmodel) .....	20
8. Intervention, Messphase, Narkoseausleitung .....	22
9. Neurologische Nachuntersuchungen .....	23
10. Auswertung der aufgezeichneten Hirndruck-, Blutdruck- und zerebralen Blutfluss- Messwerte:.....	24

11. Histologiegewinnung.....	25
12. Bestimmung des Schweregrads der SAB .....	25
13. Histologische Färbungen .....	26
14. Quantitative Histologie.....	27
15. Angaben zur statistischen Auswertung .....	28
E. Datenanalyse / Ergebnisse.....	29
1. Gewicht.....	29
2. Blutgase .....	30
5.1 pH-Wert.....	30
5.2 Sauerstoffpartialdruck (pO <sub>2</sub> ).....	30
5.3 Kohlenstoffdioxidpartialdruck (pCO <sub>2</sub> ) .....	31
3. Mittlerer arterieller Blutdruck (MABP) .....	31
4. Intrakranieller Druck (ICP) .....	32
5. Zerebraler Perfusionsdruck (CPP).....	34
6. Lokaler zerebraler Blutfluss (LZBF).....	35
9.1 LZBF 1 (ipsilateral).....	35
9.2 LDF 2 (kontralateral).....	36
7. Mortalität .....	37
8. Neurologische Nachuntersuchung .....	38
9. Ausmaß der SAB .....	39
10. Immunhistochemie (Caspase3).....	40
F. Diskussion .....	42
1. Das endovaskuläre Perforationsmodell .....	42
2. Auswahl der Arzneimittel, Dosierung und Zeitpunkt der Applikation .....	44
3. Physiologische Parameter.....	46
4. Mortalität und Neurologische Nachuntersuchung .....	51

5. Ausmaß der SAB und histologischer Schaden .....	53
G. Zusammenfassung .....	55
H. Literaturverzeichnis .....	56
I. Abbildungsverzeichnis .....	64
J. Danksagung.....	1
K. Lebenslauf.....	2

## **A. Einleitung**

“When persons in good health are suddenly seized with pains in the head and straightaway are laid down speechless and breathe with stertor, they die in seven days when fever comes on”[1]

Mit diesen Worten beschrieb bereits Hippocrates das akute Krankheitsbild einer Subarachnoidalblutung (SAB). 2400 Jahre später hat diese Erkrankung nichts an Schrecken verloren. Zwar gab es in den letzten Jahrzehnten große Fortschritte in der chirurgischen, interventionellen und intensivmedizinischen Behandlung dieser Patienten. Doch spezifische Therapieansätze für die Akut- und Langzeitfolgen nach der erfolgreichen Aneurysmaausschaltung gibt es bisher nicht.

Zusätzlich zu Nachblutungen und dem erhöhtem Hirndruck scheint vor allem auch die frühe Hirnschädigung („Early brain injury“, EBI), innerhalb der ersten 72 Stunden im Anschluss an eine SAB für die hohe Mortalität und Morbidität verantwortlich zu sein [2, 3].

In der Literatur wird inflammatorischen Vorgängen, neben Durchblutungsstörungen und metabolischen Veränderungen, eine große Rolle bei der Entstehung struktureller Schäden des Gehirns und bleibenden neurologischen Defiziten zugeschrieben.

Für das Glukokortikoid Methylprednisolon und das Tetrazyklin- Antibiotikum Minozyklin konnte aufgrund ihrer vielseitigen antiinflammatorischen Eigenschaften ein Nutzen in der Behandlung anderer neurologischer Erkrankungen mit entzündlicher Komponente nachgewiesen werden.

In dieser Arbeit wird mit Hilfe einer tierexperimentellen randomisierten und kontrollierten Studie der Effekt von Methylprednisolon und Minozyklin auf die frühe Hirnschädigung nach einer SAB untersucht.

## **B. Grundlagen**

### 1 Die Subarachnoidalblutung (SAB)

#### 1.1 Definition und Epidemiologie

Die Subarachnoidalblutung (SAB) ist ein akutes Ereignis, bei dem Blut aus subarachnoidalen arteriellen oder venösen Blutgefäßen in den mit Liquor cerebrospinalis gefüllten Spaltraum zwischen der Spinnwebhaut (Arachnoidea) und der weichen Hirnhaut (Pia mater) tritt. Je nach Lokalisation kann das Blut auch in das Hirnparenchym, die Hirnventrikel oder den subduralen Raum einströmen. Während Blutungen aus venösen Gefäßen in der Regel mit geringen Symptomen einhergehen und einen unkomplizierten Verlauf nehmen, ist die Blutung aus arteriellen Gefäßen, insbesondere die Blutung aus einem rupturierten Aneurysma der Hirnbasisarterien, eine Erkrankung, die ein hohes Mortalitäts- und Morbiditätsrisiko hat.

Die Inzidenz der aneurysmatischen Subarachnoidalblutung beträgt 9 von 100.000 pro Jahr [4], was ca. 36.000 Fälle jährlich in der Europäischen Union bedeutet [5]. Mit der hohen Gesamtsterblichkeitsrate von ungefähr 50% [6], dem relativ jungen mittlerem Erkrankungsalter von 50- 60 Jahren [4] und der Tatsache, dass gut die Hälfte aller überlebenden Patienten auf Betreuung angewiesen ist, ist die aneurysmatische SAB eine schwerwiegende neurologische Erkrankung, die großes persönliches Leid und hohe Kosten für das Gesundheitswesen verursacht [7, 8].

Obwohl die SAB lediglich für 6 – 10% aller zerebrovaskulären Erkrankungsfälle ursächlich ist, liegen ihr ca. 25% der zerebrovaskulären Todesfälle zu Grunde [2]. 10 - 15% der Patienten versterben sogar bevor sie das Krankenhaus erreichen [9].

#### 1.2 Ätiologie

Die häufigste Ursache für eine Subarachnoidalblutung ist die Zerreißung von – meist kleinen – kortikalen Blutgefäßen im Rahmen eines Schädel-Hirn-Traumas (traumatische

SAB). Dieses Krankheitsbild ist nicht Gegenstand dieser Arbeit. Die Ursachen für eine spontane Subarachnoidalblutung lassen sich drei Kategorien zuordnen [10]:

- Rupturen eines arteriellen Aneurysmas (dünnwandige Gefäßaussackung), verantwortlich für 85% der SABs.
- Nicht-aneurysmatische, benigne perimesencephale Blutungen, ursächlich in 10% der Fälle.
- Seltene andere Ursachen (5% der Fälle), z.B. inflammatorische Gefäßläsionen (Borreliose, Wegener Granulomatose, uva.), nicht-inflammatorische Gefäßläsionen (Arteriendissektion, uva.), Tumore, Drogenabusus (z.B. Kokain)

Intrakranielle Aneurysmen treten hauptsächlich an den Abgängen von Arterien, besonders am Circulus Willisi der Schädelbasis und nahe gelegenen Abgängen auf [10]. Scherkräfte im Blutstrom sorgen in Kombination mit einer Bindegewebsschwäche dafür, dass sich im Laufe des Lebens Aussackungen der Gefäßwand bilden. Die Prävalenz unter Erwachsenen beträgt 2 – 5%. Aneurysmen können familiär gehäuft auftreten und weisen außerdem eine höhere Prävalenz bei Patienten mit polyzystischer Nierenerkrankung, Ehlers-Danlos-, Marfan-Syndrom und fibromuskulärer Dysplasie auf [5]. Die Prävalenz ist in Finnland und Japan erhöht. Das Rupturrisiko eines Aneurysmas steigt mit seiner Größe [10] und ist ferner abhängig von seiner Lokalisation, dem Geschlecht des Patienten (für Frauen beträgt das relative Risiko (RR) 2,1) und der Tatsache ob es bereits Symptome verursacht [11].

Bei der nicht-aneurysmatischen, benignen perimesencephalen Blutung handelt es sich um eine vergleichsweise harmlose Form der SAB, die vermutlich durch eine Ruptur einer Vene in der Cisterna Interpeduncularis oder Cisterna Prepontina ausgelöst wird [12]. Patienten mit dieser Erkrankung haben in aller Regel milde Symptome und weisen anschließend eine normale Lebenserwartung auf [13].

Die wichtigsten Risikofaktoren für das Auftreten sowohl eines Aneurysmas, als auch für dessen Ruptur, sind Nikotinkonsum (RR 2,2), arterielle Hypertension (RR 2,5), exzessiver Alkoholkonsum (RR bei einem Konsum von mehr als 150g pro Woche: 2,1),



sowie weibliches Geschlecht (RR 1,6), besonders ab der 5. Lebensdekade [5, 14]. Außerdem werden in verschiedenen Artikeln weitere Risikofaktoren diskutiert, wie z.B. Hypercholesterinämie, kardiovaskuläre Ereignisse und frühzeitige zerebrovaskuläre Ereignisse bei der Mutter [5, 14, 15]

### 1.3 Pathogenese

Durch den Austritt von Blut aus dem Gefäßlumen im Zuge einer Subarachnoidalblutung kommt es zu einem plötzlichen Anstieg des intrakraniellen Druckes (ICP). Als Folge davon nimmt der zerebrale Perfusionsdruck (CPP) ab. Der CPP errechnet sich aus der Differenz vom mittleren arteriellen Blutdruck (MABP) und ICP. Es entsteht also nicht nur eine lokale Durchblutungsstörung, sondern in dieser Phase eine globale Ischämie und Minderversorgung des Gehirns mit Sauerstoff und Glucose. Dies kann zum ischämischen Untergang von Neuronen führen. Mit zunehmender Hirnschädigung kann sich ein zytotoxisches Hirnödem entwickeln, welches ebenfalls zu einem ICP-Anstieg führen kann.

Neben einem Hirnödem kann auch eine sekundäre Liquorzirkulationsstörung durch die Einblutung in den Subarachnoidalraum oder die Hirnventrikel entstehen. Diese kann ebenfalls zu einer weiteren Zunahme des ICP beitragen [16].

Im Anschluss an die Akutphase der Subarachnoidalblutung können sogenannte Vasospasmen auftreten. Dabei handelt es sich um spastische Einengungen von intrakraniellen Arterien, die zwischen Tag drei und Tag 21 nach der Aneurysmaruptur (typischerweise zwischen Tag fünf und Tag zehn) auftreten und angiographisch nachweisbar sind. Sie lassen sich mehr oder weniger ausgeprägt bei bis zu 70% aller Patienten mit einer SAB finden. Im betroffenen Gehirnabschnitt kommt es dabei zu einer ischämischen neuronalen Schädigung. Bei etwa 30% aller SAB-Patienten tritt eine neurologische Verschlechterung und/oder ein Infarkt als Ausdruck eines sekundären ischämischen neurologischen Defizits („Delayed Ischemic Neurological Deficit“, DIND) auf. Faktoren, die zur Entwicklung eines Vasospasmus beitragen, könnten die Freisetzung von vasokonstriktorisches Substanzen (z.B. Prostaglandine und Oxyhämoglobin) und inflammatorische Vorgänge sein [17, 18].

#### 1.4 Klinik und Klassifikation

Das Leitsymptom der SAB ist ein plötzlich einsetzender „Vernichtungskopfschmerz“. Dieser wird von vielen Patienten als der schlimmste ihres Lebens bezeichnet und ist bei bis zu einem Drittel der Patienten sogar das einzige Symptom [19]. Weitere uncharakteristische Symptome können Übelkeit, Erbrechen und eine nach wenigen Stunden einsetzende Nackensteifigkeit sein. Häufig kommt es zu einer Eintrübung des Bewusstseins, die von einem leichten, vorübergehenden Dämmerzustand, über ein tiefes, andauerndes Koma bis hin zum sofortigen Tod führen kann.

Bei Einblutungen in das Hirnparenchym, fokalen Ischämien durch Vasokonstriktion oder der Kompression von Hirnnerven kann es zu fokalen neurologischen Ausfällen oder epileptischen Anfällen kommen. In solchen Fälle kann die Unterscheidung zwischen einer SAB und einem ischämischen Schlaganfall anhand der Klinik schwierig sein [10].

Sekundäre Bewusstseinsverminderungen deuten meistens auf eine Liquorzirkulationsstörung hin, können aber auch Hinweis auf eine Nachblutung oder ein verzögertes ischämische Defizit sein [16]. Das verzögerte ischämische Defizit (DIND, delayed ischemic neurologic deficit) ist definiert als sekundäres Auftreten von fokalen Ausfällen oder Bewusstseinsverminderungen nach SAB, unter Ausschluss von anderen Ursachen [20]. DINDs werden von Vasospasmen und anderen globalen Vorgängen, wie zum Beispiel Entzündungsreaktionen, Hypovolämie oder Störungen der Blut-Hirn-Schranke, ausgelöst [10].

Die Klassifizierung einer SAB erfolgt nach unterschiedlichen Skalen:

Nach der Hunt und Hess Skala lässt sich anhand des neurologischen Status eine Einteilung in fünf Grade vornehmen (s. Abb. 1) [21].

<b>Grad</b>	<b>Symptomatik</b>
<b>0</b>	Nicht rupturiertes Aneurysma
<b>I</b>	Asymptomatisch oder nur leichter Kopfschmerz mit diskreter Nackensteifigkeit
<b>Ia</b>	Fixiertes neurologisches Defizit (z.B. Parese des N.oculomotorius) ohne meningeale Reizzeichen
<b>II</b>	Moderate bis schwere Kopfschmerzen, Nackensteifigkeit, kein neurologisches Defizit mit der Ausnahme von Hirnnervenparesen
<b>III</b>	Somnolenz, Verwirrtheit oder leichtes fokales neurologisches Defizit
<b>IV</b>	Sopor, moderate bis schwere Hemiparese, beginnende Dezerebration, vegetative Störung
<b>V</b>	Tiefes Koma, manifeste Zeichen der Dezerebration, moribundes Erscheinungsbild

Abb. 1: Klassifikation der Subarachnoidalblutung (SAB) nach Hunt und Hess [21]

### 1.5 Diagnostik

Jedes akute und heftige Kopfschmerzereignis bedarf einer notfallmäßigen Abklärung [16]. Nach einer gezielten neurologischen Untersuchung sollte bei Verdacht auf eine SAB eine native zerebrale Computertomographie (CCT) erfolgen. Frisches Blut im Subarachnoidalraum zeigt sich bei dieser Untersuchung hyperdens. Des Weiteren kann das CT Hinweise über die Lage des ursächlichen Aneurysmas, das Vorhandensein einer Liquorzirkulationsstörung oder einer zusätzlichen intrazerebralen Blutung (ICB) liefern. Durch Umverteilung und Resorption des subarachnoidalen Blutes nimmt die Sensitivität des CT im Verlauf von einigen Tagen nach der SAB ab [22].

Eine Kernspintomographie (MRT) mit Flair Technologie weist in der akuten Phase nach einer SAB eine ähnlich gute Sensitivität wie ein CT auf. Im Verlauf der Erkrankung wird das MRT dem CT zunehmend überlegen in der Detektion einer SAB. [23]

Mit Hilfe der Fisher- Skala erfolgt eine Einteilung des Ausmaßes einer SAB im CCT in vier Grade (s. Abb. 2). [24]

Fisher- Grad	Befund im CCT
1	Kein Blut sichtbar
2	Diffus Blut sichtbar oder lokalisierte Blut- Clots von <1mm Dicke in der Inselzisterne, der Cisterna ambiens oder im Interhemisphärenspalt
3	Blut-Clots von >1mm Dicke in der Inselzisterne, der Cisterna ambiens oder im Interhemisphärenspalt
4	Intrazerebrale oder intraventrikuläre Blut- Clots mit und ohne SAB

Abb. 2: Klassifikation des Ausmaßes der Subarachnoidalblutung (SAB) in der cerebralen Computertomographie (CCT) nach Fisher [25]

Im Falle eines negativen CT oder MRT muss bei Verdacht auf eine Subarachnoidalblutung eine Lumbalpunktion durchgeführt werden. Durch klaren Liquor lässt sich eine SAB innerhalb der letzten zwei bis drei Wochen ausschließen. Um bei blutigem Liquor zwischen einer iatrogenen Blutbeimengung und einer SAB unterscheiden zu können kann der Überstand des Liquorpunktates auf Xanthochromie untersucht werden. [22]

Bei bewiesener Subarachnoidalblutung muss mittels zerebraler Panangiographie oder CT- Angiographie (bzw. MR-Angiographie) nach der Blutungsquelle gesucht werden (s. Abb. 3a-c). [5]

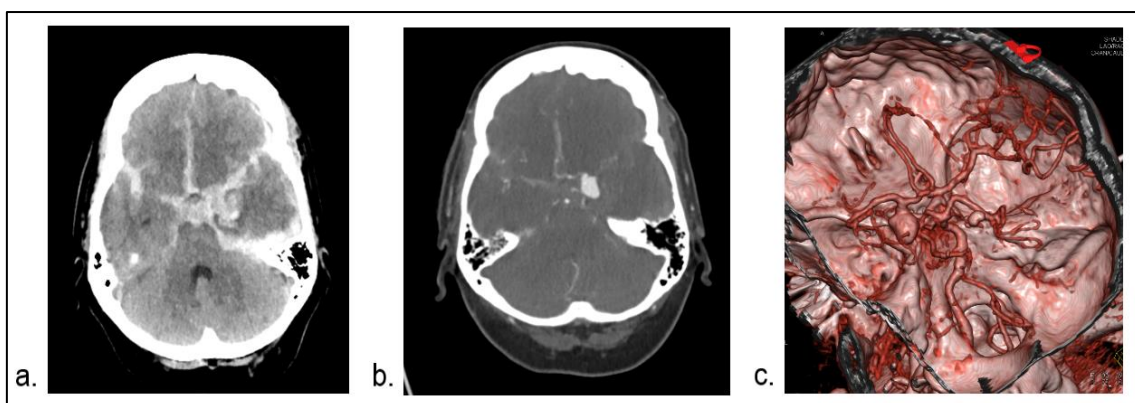


Abb. 3: a. cerebrale Computertomographie kurz nach einer Subarachnoidalblutung. Das Blut in den basalen Zisternen, der Sylvischen Fissur links und dem Interhemisphärenspalt stellt sich hyperdens dar. b. CT- Angiographie axial: rupturiertes Aneurysma der A. cerebri media links. c. Aneurysma in der 3D-Rekonstruktion der CT-Angiographie. Mit freundlicher Genehmigung, Prof. Dr. med. T. Westermaier, Würzburg.

## 1.6 Therapie

Generell müssen Patienten nach einer SAB engmaschig überwacht werden. Am besten sollte dies in einer darauf spezialisierten Intensivstation passieren [25]. Die weitere Behandlung lässt sich in Basismaßnahmen, die Therapie von Komplikationen und das Ausschalten der Blutungsquelle einteilen.

Basismaßnahmen umfassen zum Beispiel das Behandeln von Kopfschmerzen, Hyperglykämie und Fieber, sowie die Thromboseprophylaxe. Bei der Einstellung des Blutdrucks dürfen nach Aneurysmaausschaltung höhere systolische Drücke (bis ca. 180mmHg) toleriert werden, um sekundäre Ischämie durch Hypoperfusion zu vermindern. Der arterielle Mitteldruck sollte in jedem Fall in einem Bereich über 90mmHg liegen [5, 10]. Vor der Versorgung der Blutungsquelle sollten allerdings systolische Blutdruckwerte von 150mmHg nicht überschritten werden, um die Wahrscheinlichkeit auf eine erneute Blutung aus dem Aneurysma zu vermindern. Der Patient sollte ausreichend Flüssigkeit zugeführt bekommen. Dabei müssen der Elektrolythaushalt und die Urinproduktion überwacht werden.

Falls der klinische Zustand des Patienten es zulässt, sollte die Blutungsquelle früh ausgeschaltet werden, um eine Re-Ruptur des Aneurysmas zu verhindern. Dabei besteht die Möglichkeit des endovaskulären Coilings oder des chirurgischen Verschließens des Aneurysmahalses mit einem Clip. [16] Mit diesen Verfahren kann das Risiko einer Rezidivblutung drastisch gesenkt werden.

Kommt es im Rahmen der SAB zu einem gestörten Liquorabfluss oder zur massiven Einblutung in die Hirnventrikel, kann ein Hydrozephalus entstehen. Ein symptomatischer Hydrozephalus sollte intermittierend oder dauerhaft mit einer Liquorableitung behandelt werden.

Wie bereits in Kapitel 1.3 und 1.4 beschrieben gelten Vasospasmen im Anschluss an eine SAB maßgeblich als Verursacher des verzögerten ischämischen Defizits. Als Goldstandard bei der Diagnostik der Vasospasmen gilt die Angiographie. Ein Surrogatparameter für Engstellen in den Gefäßen ist die Flussgeschwindigkeit in der

transkraniellen Dopplersonographie (TDC) [26-28]. Hierbei lassen sich durch Messung von erhöhten Flussgeschwindigkeiten Hinweise auf das Auftreten von Vasospasmen erfassen. Als medikamentöse Prophylaxe wird weithin der Kalziumantagonist Nimodipin (per os, für die Dauer von drei Wochen) angewendet [29]. Auch Magnesiumsulfat soll sich günstig auf das Entwickeln von Vasospasmen auswirken [30]. Für viele andere Stoffe, wie zum Beispiel, Tirilazad oder Statine, konnte in Studien bisher kein positiver Effekt nachweisen werden [31-35].

Ein weit verbreitetes Verfahren für die Therapie von Vasospasmen ist die sogenannte Tripel-H Therapie [36]. Durch induzierte Hypervolämie, Hypertension und Hämodilution soll die Durchblutung ischämischer Areale verbessert werden. Der Nutzen dieser Strategie in Bezug auf die Morbidität und Mortalität der Patienten ist bis heute umstritten [37]. Insbesondere die Hypervolämie kann dabei mit systemischen Komplikationen verbunden sein, insbesondere einer kardialen Dekompensation und einem iatrogenen Lungenödem.

Weitere Therapiestrategien, wie zum Beispiel eine kontrollierte, induzierte Hyperkapnie, zur Verbesserung der zerebralen Durchblutung werden derzeit im Rahmen von klinischen Studien untersucht [38].

### 1.7 Stand der Wissenschaft – die „Early brain injury“

Nicht nur die hohe initiale Mortalität, sondern auch das schlechte neurologische Outcome der Überlebenden machen die SAB zu einer gefürchteten Erkrankung.

Lange Zeit galten vor allem die verspätet auftretenden Vasospasmen als Auslöser des verzögerten ischämischen Defizits („Delayed Ischemic Neurological Deficit“, DIND) und somit der bleibenden körperlichen Einschränkungen der Patienten [39]. Allerdings zeigten klinische Studien (z.B. die CONSCIOUS-Studie), dass sich durch das erfolgreiche Verhindern der Vasospasmen das neurologische Outcome der Patienten nicht signifikant verbessern ließ [40, 41]. Außerdem konnte nachgewiesen werden, dass 21% der SAB-Überlebenden ein verzögertes ischämisches Defizit entwickelten, ohne dass hochgradige Vasospasmen nachgewiesen wurden. Weiterhin wiesen lediglich 20 – 30 % der Patienten mit bewiesenen Vasospasmen auch ein DIND auf [42].

Nach diesen Erkenntnissen rückten die Pathomechanismen, die unmittelbar im Anschluss an das Entstehen einer SAB auftreten in den Mittelpunkt der Forschung. In diesem Zusammenhang wurde der Begriff „Early Brain Injury“ (EBI, frühe Gehirnschädigung) für die Vorgänge innerhalb der ersten Stunden nach einer SAB geprägt. In diversen experimentellen und klinischen Studien konnte nachgewiesen werden, dass das Ausmaß der unmittelbar nach einer SAB auftretenden Gehirnschädigung maßgeblich mit der Mortalität und Morbidität der Erkrankung zusammenhängt [2, 3, 43, 44]. Der Einfluss der EBI auf die schwerwiegenden Langzeitfolgen nach einer SAB machen sie zu einem interessanten Ansatz für neue Therapiestrategien.

Die Mechanismen der EBI und vor allem deren Zusammenhänge sind noch nicht vollständig aufgeklärt. Neben mechanischen und physiologischen Veränderungen der Blutversorgung durch das in den Subarachnoidalraum ausgetretene Blut spielen unter anderem Verschiebungen im Ionenhaushalt, Beschädigung der Endothelbarriere und die Aktivierung verschiedener Signalkaskaden eine Rolle in der Entstehung der frühen Hirnschädigung [44-47].

Auch inflammatorische Vorgänge scheinen einen wichtigen Beitrag zur EBI zu leisten. In experimentellen Studien konnte die vermehrte Anwesenheit von Zelladhäsionsmolekülen und immunaktiven Zytokinen bereits früh nach einer SAB nachgewiesen werden [48-51]. Es wird angenommen, dass die Anhäufung von Hämoglobin im Subarachnoidalraum und freiliegende Kollagenfasern eine Immunreaktion auslösen [52]. Dabei kommt es zur Freisetzung von Immunmodulatoren und der Einwanderung von Leukozyten und Makrophagen in das Gehirnparenchym. Durch den gestörten Blut- und Liquorabfluss akkumulieren die Leukozyten und Makrophagen. Es resultiert eine massive Degranulation dieser Zellen, wodurch sich weitere Enzyme und Botenstoffe des Immunsystems im Hirnparenchym anhäufen.

Weiterhin entstehen durch den Untergang von Erythrozyten und Leukozyten freie Sauerstoffradikale, die wiederum gesunde umliegenden Neuronen und Endothelzellen angreifen [44, 53]. Durch die freien Radikale und die Immunmediatoren kommt es lokal,

aber auch global im Gehirn zu Vasokonstriktion und Entzündung. Letztendlich führen diese Vorgänge durch oxidativen und ischämischen Stress zu unkontrollierter Apoptose und Nekrose. [54, 55]. In Abbildung 4 ist eine vereinfachte Übersicht der Pathomechanismen, die im Rahmen der EBI ablaufen, dargestellt.

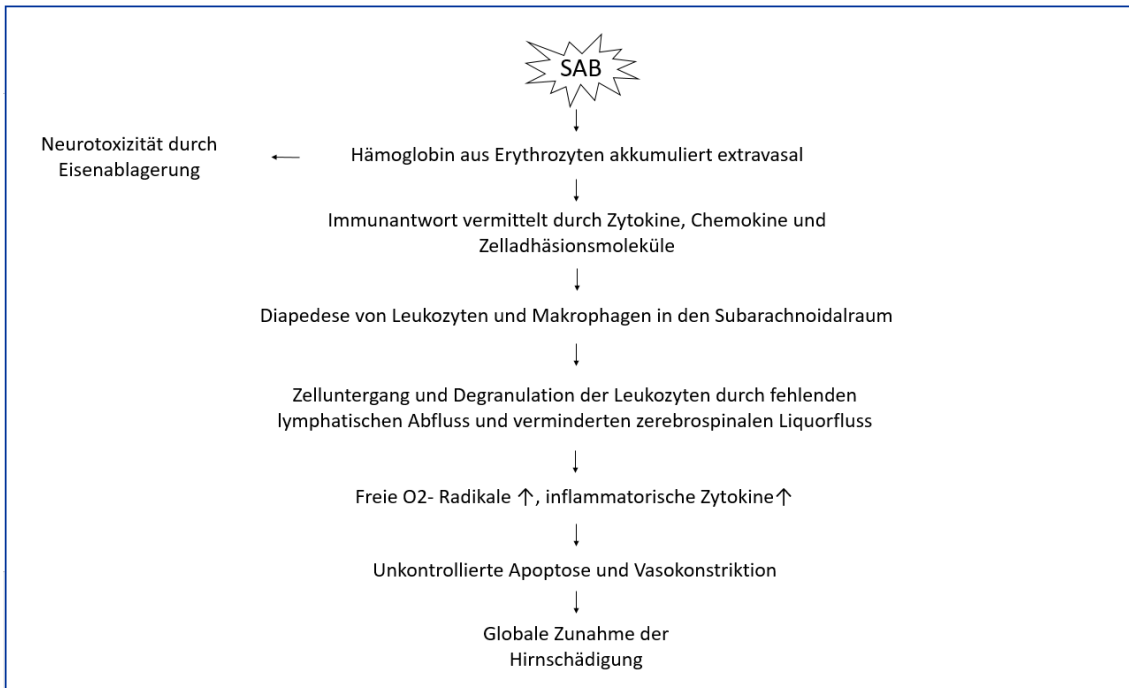


Abb.4: Vereinfachte Übersicht über Pathomechanismen im Rahmen der „Early Brain Injury“ nach Subarachnoidalblutung (SAB). Eigene Abbildung.

## 2 Methylprednisolon

Methylprednisolon ist ein Glukokortikoid. Im Vergleich zu anderen Derivaten des Cortisols hat es eine zu vernachlässigende mineralokortikoide Wirkung und eine längere Halbwertszeit. Wie andere Glukokortikoide findet Methylprednisolon Anwendung bei einer Vielzahl entzündlicher Erkrankungen. Die Therapie mit Methylprednisolon ist kostengünstig und das Nebenwirkungsprofil von Glukokortikoiden gut untersucht.

Wie in Kapitel 1.7 beschrieben spielen inflammatorische Vorgänge eine große Rolle in der Entstehung der Early Brain Injury nach einer SAB. Methylprednisolon inhibiert dahingegen, durch seine Wirkung am Glukokortikoidrezeptor, eine Vielzahl von Signalkaskaden, die an der Produktion von immunaktiven Zytokinen, Chemokinen und Zelladhäsionsmolekülen beteiligt sind. So wird zum Beispiel die Aktivität des



Transkriptionsfaktors NF-kappa B, der Proteinase Calpain und der Proteinkinase C herabreguliert [56-58].

Durch die Inhibierung der Prostaglandinsynthese und Relaxierung von glatten Muskelzellen wirkt Methylprednisolon der Vasokonstriktion von zerebralen Gefäße entgegen. In experimentellen Studien wurde daher eine Stabilisierung des lokalen zerebralen Blutflusses (LZBF) im Anschluss an die SAB gemessen [58-61].

Weiterhin wirkt Methylprednisolon in hoher Dosierung membranstabilisierend durch das Hemmen der Radikalevermittelten Lipidperoxidation. Diese Eigenschaft konnte bei der Behandlung von Patienten mit einer Rückenmarksverletzung und experimentell bei Ratten nach SAB nachgewiesen werden [62, 63]. In Abbildung 5 ist eine vereinfachte Übersicht der vermuteten Wirkmechanismen von Methylprednisolon im Rahmen der EBI dargestellt.

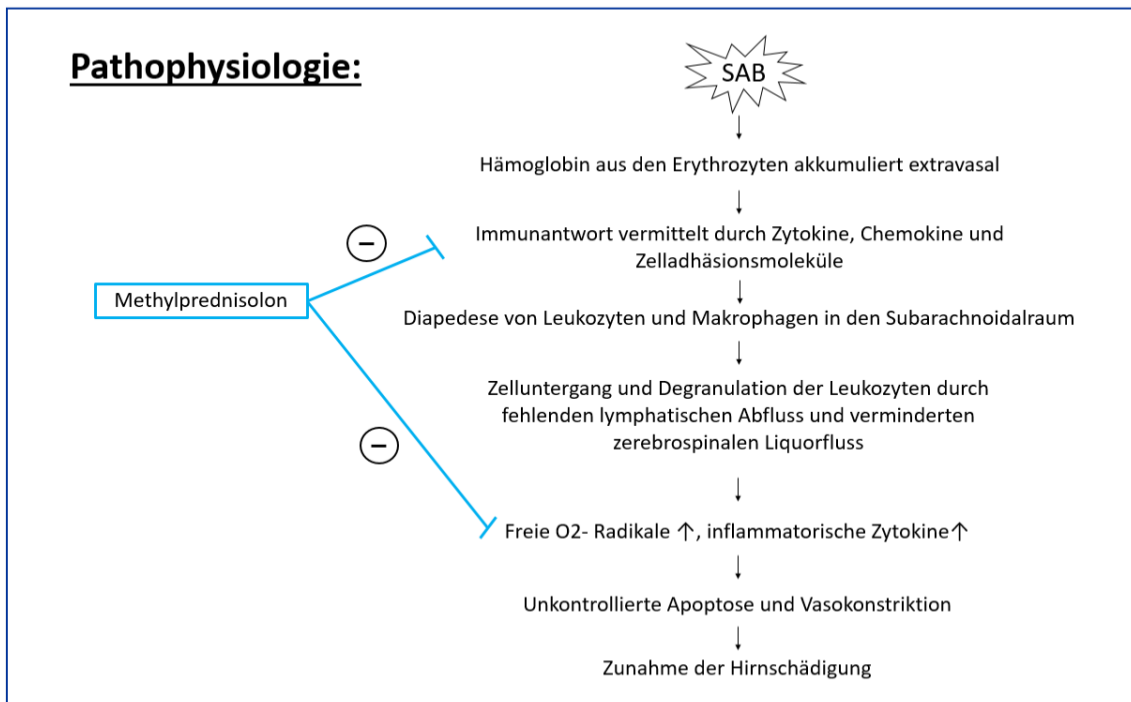


Abb. 5: Vereinfachte Übersicht über den erwarteten Wirkmechanismus von Methylprednisolon im Rahmen der Subarachnoidalblutung (SAB). (⊖= „Hemmende Wirkung“). Eigene Abbildung.

Kürzlich gelang es Gomis et al. in einer randomisierten und kontrollierten, klinischen Studie zu zeigen, dass es Patienten, die im Anschluss an eine SAB mit Methylprednisolon behandelt wurden, ein Jahr nach der SAB klinisch signifikant besser ging als nicht mit Steroiden behandelten Patienten [64].

### 3 Minozyklin

Minozyklin ist ein Tetrazyklin-Antibiotikum der zweiten Generation. Neben dem antibiotischen sind in der Literatur auch weitere Effekte von Minozyklin beschrieben. Aufgrund seiner hohen Lipophilie diffundiert es besonders gut durch die Blut-Hirn-Schranke [65-67]. So konnte in diversen experimentellen und klinischen Studien eine neuroprotektive Wirkung des Arzneimittels nachgewiesen werden. Anwendungsmöglichkeiten ergeben sich in den veröffentlichten Studien nicht nur bei neurodegenerativen Krankheiten (Multiple Sklerose, Morbus Parkinson, Amyotrophe Lateralsklerose, uva.) sondern auch bei neurovaskulären Erkrankungen, wie zum Beispiel dem ischämischen Schlaganfall [68-70].

In experimentellen Modellen der Subarachnoidalblutung konnten die Arbeitsgruppen von Guo et al. und Sherchan et al. zeigen, dass Minozyklin das klinische Outcome von Ratten verbessert [71, 72].

Das hohe neuroprotektive Potential beruht vor allem auf den anti-inflammatorischen, anti-apoptotischen und membran-stabilisierenden Fähigkeiten. So werden durch Minozyklin Enzyme wie die Matrix-Metallo-Protease 9, die Phospholipase A2 oder das Interleukin-1 $\beta$ -Converting Enzym inhibiert, die maßgeblich an entzündlichen Prozessen und Membrandestabilisierung beteiligt sind [71, 73-75]. Auch die Wirkung von Zytokinen aus Zellen des Immunsystems, wie zum Beispiel der Tumor-Nekrosefaktor- $\alpha$ , Interleukin-6 oder Interleukin-1 $\beta$ , wird durch das Antibiotikum direkt gehemmt [69, 70].

Apoptosevorgänge spielen eine große Rolle in der Entstehung der Zellschädigung nach einer SAB [54, 55]. In verschiedenen experimentellen Modellen konnte nachgewiesen werden, dass Minozyklin sowohl den Caspase-abhängigen als auch den Caspase-unabhängigen Signalweg der Apoptose hemmt [76-78].

Des Weiteren reduziert Minozyklin den oxidativen Schaden durch Sauerstoffradikale, die durch den vermehrten Untergang von Leukozyten im extrazellulären Raum entstehen [79]. Außerdem wird angenommen, dass die Fähigkeit der Tetrazyklin- Antibiotika, Eisen in Chelaten zu binden, die Neurotoxizität von akkumulierendem Hämoglobin vermindert [70].

Aufgrund der langen klinischen Erfahrung mit Minozyklin als Antibiotikum ist die Pharmakokinetik und das Nebenwirkungsprofil hinreichend bekannt [69]. In Abbildung 6 ist eine vereinfachte Übersicht der vermuteten Wirkmechanismen von Minozyklin im Rahmen der EBI dargestellt.

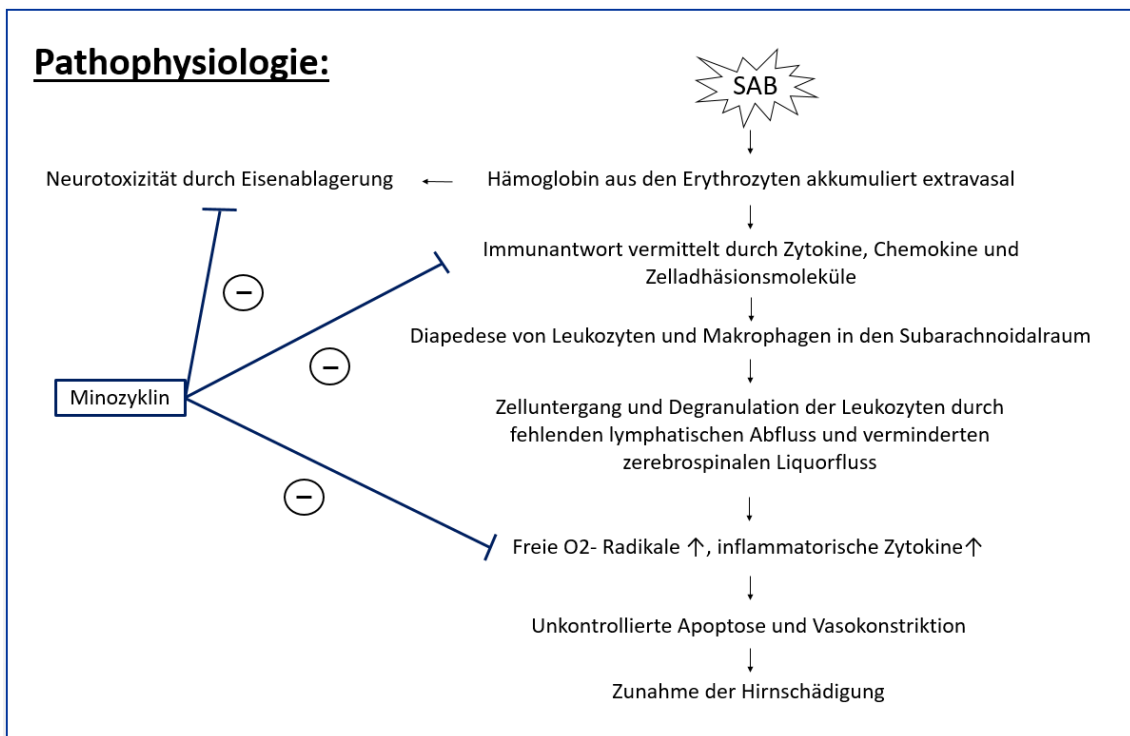


Abb. 6: Vereinfachte Übersicht über den erwarteten Wirkmechanismus von Minozyklin im Rahmen der Subarachnoidalblutung (SAB). (⊖= „Hemmende Wirkung“). Eigene Abbildung.

## **C. Fragestellung**

Die vorliegende Arbeit dient dem Zweck den Einfluss von Methylprednisolon und Minozyklin auf die frühe Phase nach der Subarachnoidalblutung unter experimentellen Bedingungen zu untersuchen. In diesem Zusammenhang sollte die entzündungshemmende Wirkung der beiden Arzneimittel, sowie deren Einfluss auf die Pathophysiologie und Symptomatik der Subarachnoidalblutung näher betrachtet werden.

Hierbei sollten vor allem die frühe Gabe der Stoffe (30 Minuten nach SAB) und die, im Vergleich zu anderen Studien, hohe Dosierung von Methylprednisolon neue Erkenntnisse und Therapieansätze liefern. Die Arbeit wurde im Rahmen eines umfassenden Projekts durchgeführt, die die neuroprotektive Wirkung von Medikamenten und Methoden testet, die in bekannte pathophysiologische Prozesse der Frühphase der SAB (EBI) eingreifen.

Die folgenden Hypothesen wurden auf ihre Richtigkeit überprüft:

1. Sowohl Methylprednisolon als auch Minozyklin haben einen günstigen Einfluss auf die Hirndurchblutung, den Hirndruck und den zerebralen Perfusionsdruck unmittelbar nach einer SAB.
2. Durch die frühe Gabe von Methylprednisolon und Minozyklin nach SAB werden intrazerebrale Entzündungsvorgänge gehemmt und somit der Hirnschaden vermindert.
3. Die frühzeitige Gabe von Methylprednisolon und Minozyklin verbessert die neurologische Symptomatik nach einer experimentellen SAB.

## **D. Methoden**

Zur Überprüfung der Fragestellung wurde ein kontrolliertes, randomisiertes Tierexperiment mit drei Versuchsgruppen durchgeführt. Als Modell einer Subarachnoidalblutung diente das endovaskuläre Perforationsmodell bei Ratten, welches erstmalig von Bederson et al. [3] beschrieben wurde.

Die Versuche wurden in der Neurochirurgischen Klinik und Poliklinik, Universitätsklinikum Würzburg, an einem zur Operation von Ratten geeigneten Arbeitsplatz durchgeführt.

### 1. Versuchstiere

Für die Versuche wurden 35 männliche Sprague-Dawley-Ratten (aus der Tierzucht von Charles River, Sulzfeld, Deutschland) mit einem Gewicht zwischen 270 – 470g verwendet. Die Genehmigung der örtlichen Tierschutzkommission liegt unter dem Aktenzeichen 55.2-2531.01-16/10 vor.

Bis zur Operation wurden die Ratten im Tierstall der Kopfklinik des Universitätsklinikums Würzburg einquartiert. Für den Versuch wurden die Ratten randomisiert einer der drei Versuchsgruppen zugeteilt (Kontrollgruppe, Methylprednisolon-Gruppe, Minozyklin-Gruppe) und nach unten beschriebenem Procedere operiert und nachbeatmet. Im Anschluss an die Operation wurden die Ratten für 24 Stunden in Käfigen mit ausreichend Nahrung und Wasser auf einer Wärmplatte im Tier-OP gehalten.

### 2. Gewichtskontrollen

Vor der Operation wurden die Versuchstiere gewogen. Nach 4 bzw. 24 Stunden erfolgten erneute Gewichtskontrollen.

### 3. Narkose und Beatmung

Die Narkoseeinleitung erfolgte in einem Behälter mit 4%igem Isofluran (Isofluran CP, CP-Pharma Handelsges. mbH, Burgdorf, Deutschland). Anschließend wurden die Ratten unter Zuhilfenahme eines OP- Mikroskops (f170 System, Carl Zeiss, West Deutschland) unter Sicht oral intubiert. Als Trachealtubus diente eine Venenverweilkanüle (16G Vasofix® Safety, B.Braun, Melsungen, Deutschland).

Nach erfolgreicher Intubation wurden die Tiere durch einen druckgesteuerten Kleintierrespirator (Animal respirator 4500, Rhema Labortechnik, Hofheim, Deutschland) beatmet. Die Beatmung erfolgte mit einem Luft-Sauerstoff-Gemisch in einem Verhältnis von 1 : 0,3 und einer anfänglichen Beatmungsfrequenz von 100/Minute. Die ausreichende Ventilation wurde durch eindeutige erkennbare beatmungssynchrone Thoraxexkursionen verifiziert.

Nach endotrachealer Intubation erfolgten die chirurgischen Maßnahmen unter Isoflurannarkose (2,5% für die chirurgischen Maßnahmen, 1-1,5% für die anschließende Monitoringphase). Die Augen und Zunge der Ratten wurden mit einem Gel (Corneregel®, Bauch & Lomb GmbH, Heidelberg, Deutschland) vor dem Austrocknen geschützt.

### 4. Temperaturkontrolle

Über eine Temperatursonde (KS 40-1 universal), die unter den linken M. temporalis platziert wurde, wurde die Körper-/Hirntemperatur gemessen und über einen Feedbackmechanismus mit Hilfe von Rotlichtlampen auf ca. 37 Grad Celsius konstant gehalten.

### 5. Blutdruckmessung und Blutgasanalyse

Zur kontinuierlichen Messung des mittleren arteriellen Blutdrucks (MABP) und Entnahme von arteriellem Blut für Blutgasanalysen (BGA) wurde ein Katheter (Portex® 0,58x 0,96mm Polyethylenschlauch, Smiths Medical, Kent, UK) in die Schwanzarterie

eingbracht. Der Katheter war an einen Überwachungsmonitor (Servomed, Hellige GmbH, Freiburg im Brsg., Deutschland) angeschlossen. Der gemessene Wert wurde über ein Datenmanagementsystem (Labview Powerlab®, ADInstruments, Pty, Ltd, Castle Hill, Australien) an einen Computer (PowerMac G3, Apple, Cupertino, Kalifornien, USA) gesendet und mit Hilfe der dazugehörigen Software (Charts v4.2 Powerlab®, ADInstruments, Pty, Ltd, Castle Hill, Australien) aufgezeichnet.

Um ein Thrombosieren der Schwanzarterie und des Polyethylenkatheters zu verhindern wurde der Katheter kontinuierlich mit Sterofundin® (Sterofundin Iso, B.Braun, Melsungen, Deutschland) über ein Perfusorsystem (Injectomat CP-IS, Fresenius HemoCare GmbH, Bad Homburg, Deutschland) gespült. Auf diese Art konnte gleichzeitig der intraoperative Flüssigkeitsbedarf der Versuchstiere gedeckt werden.

Die erste Blutgasanalyse wurde unmittelbar nach dem Anlegen des Schwanzkatheters abgenommen. Anhand der Blutgase ließ sich die Beatmung der Versuchstiere überprüfen, um gegebenenfalls die Beatmungsparameter anzupassen. Zielwerte waren dabei:

- pH: 7,36 – 7,44
- pCO<sub>2</sub>: 36 – 44 mmHg
- pO<sub>2</sub>: 90 – 130 mmHg

Orientierungswerte für die Beatmungsparameter waren:

- Beatmungsdruck: 90 – 140 mmH<sub>2</sub>O
- Beatmungsfrequenz: 85 – 110/ Minute
- Luft: 1,0 – 1,5 mmH<sub>2</sub>O
- O<sub>2</sub>: 0,3 – 0,4 mmH<sub>2</sub>O
- Isofluran: 2,5 für chirurgische Maßnahmen, 1 – 1,5 % für das Monitoring

Bei Werten außerhalb des Normbereichs wurden die Beatmungsparameter entsprechend adaptiert. Weitere Blutgasanalysen wurden kurz vor dem Auslösen der SAB (Wert 0) und anschließend in stündlichem Intervall (60 Min., 120 Min., 180 Min.) entnommen

## 6. Messung des Hirndrucks und des zerebralen Blutflusses

Der Hirndruck (ICP) wurde intraoperativ mit einer Camino-Hirndrucksonde (Integra Neurosciences, San Diego, Kalifornien, USA) in Verbindung mit einem Hirndruck-Messgerät (V420, Camino Laboratories, San Diego, Kalifornien, USA) gemessen. Vor Beginn der Messung wurde ein Nullabgleich der Sonde durchgeführt.

Der lokale zerebrale Blutfluss („Local Cerebral Blood Flow“, LCBF) wurde mittels Laser-Doppler-Flowmetrie (LDF) gemessen. Im vorliegenden Versuch wurden hierfür je eine Laser-Doppler-Sonde (Typ P5bs, Moor Instruments, Axminster, Großbritannien) für die linke (LDF 1) und rechte (LDF 2) Hemisphäre verwendet. Die Sonden waren an ein Messgerät (MBF3D-Laserdoppler Messgerät, Moor Instruments, Axminster, Großbritannien) angeschlossen und wurden in regelmäßigen Abständen an einer Eichlösung kalibriert.

Zur Anlage der Sonden wurde die Schädelkalotte der Ratten in Bauchlage durch eine mediane Inzision freigelegt (s. Abb. 7). Mit einem 2mm Diamantbohrer (KaVo Elektrotechnisches Werk GmbH, Leutkirchen im Allgäu, Deutschland) wurde ein Bohrloch 1mm ventral und 2 mm rechts lateral des Bregmas in die Schädelkalotte gefräst. Die Dura mater wurde bipolar koaguliert und eröffnet, um nach Umlagerung die intraparenchymale ICP-Sonde einbringen zu können (siehe unten). Zusätzlich wurde je ein Bohrloch 2 mm hinter der Koronarnaht, 5 mm lateral der Mittellinie auf beiden Seiten in die Schädeldecke gebohrt, um hier nach der Umlagerung die LDF-Sonden für die LCBF-Messung anlegen zu können. Hier wurde die Dura mater nicht eröffnet um ein valides Messsignal aus dem darunter liegenden Kortex zu erhalten.

Anschließend erfolgte die Umlagerung des Tieres. Nachdem das Tier in Rückenlage gedreht und mittels Trommelfell schonender Ohrstifte („non-perforating earbars“) in einem stereotaktischen Rahmen fixiert wurde, konnten die ICP-Sonde und die zwei Laser-Doppler Sonden (LDF 1 und 2) mit Hilfe von Mikromanipulatoren unter Sicht - durch eine Spiegel - von unten in den Bohrlöchern platziert werden. Die ICP-Sonde wurde ca. 2mm tief in das Hirnparenchym geschoben, während die LDF-Sonden lediglich der Dura mater aufgelegt wurden.



Die gemessenen ICP- und LDF-Werte wurden ebenso wie die MABP-Werte (siehe oben) über das Powerlab®-Datenkollektionssystem an den Computer gesendet und mittels Chart-Software aufgezeichnet.

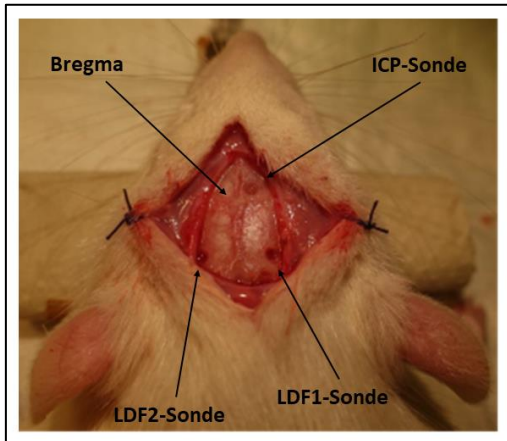


Abb. 7: Knöcherner Rattenschädel nach medianer Freilegung mit Position der Bohrlöcher für die Messsonden (ICP = Hirndruck, LDF = Laser-Doppler-Flowmetrie). Mit freundlicher Genehmigung, Prof. Dr. med. T. Westermaier, Würzburg.

## 7. Auslösung der SAB (endovaskuläres Perforationsmodell)

Über eine paramediane Inzision rechts wurde der Hals der Versuchstiere eröffnet, das Platysma stumpf auseinander präpariert und die Speicheldrüse zur Seite gelegt. Anschließend wurden der M. digastricus zusammen mit dem M. sternocleidomastoideus sowie der M. sternohyoideus unter jeweils einen Hakensperrer geklemmt. Nun konnte die A. carotis communis (ACC), inklusive der Karotisbifurkation und deren Abgänge in ihrem Verlauf frei präpariert und dargestellt werden. Ein früher medialer Ast der A. carotis externa (ACE) wurde koaguliert und durchtrennt.

Anschließend wurde die ACE unterminiert und mit zwei Ligaturen versehen. Die obere (distale) wurde unter das Zungenbein geschoben und festgezogen. Die untere (proximale) nahe der Bifurkation vorgelegt. Für die Ligaturen wurden 7-0 Vicryl©-Fäden (Ethicon, Inc., Somerville, New Jersey, USA) verwendet. Auf die ACC und A. carotis interna (ACI) wurde jeweils ein temporärer Aneurysmaclip gesetzt, die ACE zwischen den beiden Ligaturen angeschnitten und der 3-0 Prolene©-Faden (Ethicon, Inc., Somerville, New Jersey, USA) in das Gefäßlumen eingeführt.

Nachdem der Prolene©-Faden bis in die ACC vorgeschoben war, konnte die untere, proximale, Ligatur zugezogen und die ACE distal der Einschnittsstelle durchtrennt werden. Nun wurde der Faden zusammen mit dem ACE Stumpf in Richtung der ACI umgeklappt. Anschließend wurden die Clips entfernt und der Faden bis zum Auslösen der SAB in die ACI vorgeschoben (s. Abb. 8). Bei Blockade der A. cerebri media (Middle Cerebral Artery, ACM) ist zunächst ein einseitiger ipsilateraler Abfall des LCBF erkennbar.

Bei weiterem Vorschieben des Fadens erfolgt nun die Gefäßperforation und somit das Auslöse der SAB. Als Erfolgskontrolle dienten hierbei ein rasch ansteigender Hirndruck, sowie ein ipsi- und nun auch kontralateral (LDF2) rasch abfallender LDF-Wert. Um einerseits eine ausreichende Perfusion des betroffenen Gefäßes und andererseits eine SAB relevanten Ausmaßes sicherzustellen, wurde der Faden anschließend möglichst rasch bis kurz vor die Karotisbifurkation zurückgezogen.

Nach erfolgreich ausgelöster SAB konnte der Prolene©-Faden entfernt, der ACE Stumpf koaguliert und der Hals des Versuchstiers wieder schichtweise verschlossen werden.

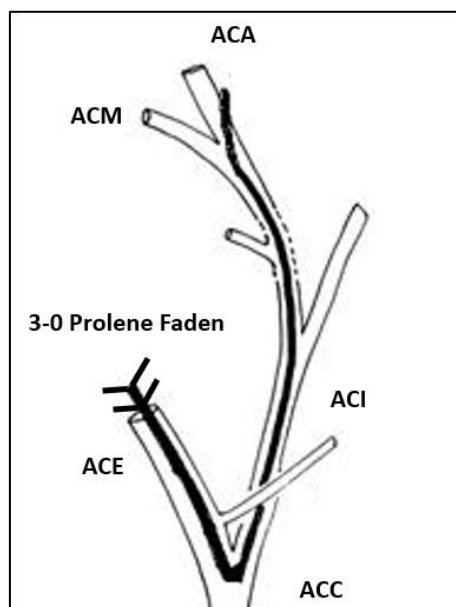


Abb. 8: Technik der endovaskulären Perforation: Ein 3-0 Prolene©-Faden wird über die A. carotis externa (ACE) soweit in die A. carotis interna (ACI) vorgeschoben bis es zur Gefäßperforation am Circulus arteriosus cerebri kommt. (ACC = A. carotis communis, ACM = A. cerebri media, ACA = A. cerebri anterior). Mit freundlicher Genehmigung, Prof. Dr. med. T. Westermaier, Würzburg.

## 8. Intervention, Messphase, Narkoseausleitung

Vier Tiere wurden wegen komplizierter Narkoseeinleitung bzw. Intubation nicht weiter analysiert. Die verbleibenden 31 Tiere wurden im Anschluss an das Auslösen der SAB nach dem Zufallsprinzip einer von drei Versuchsgruppen zugeteilt:

- Methylprednisolon-Gruppe (n=10): Einmalige, intraperitoneale Gabe von 16 mg pro Kg Körpergewicht Methylprednisolon (Urbason® soluble 16 mg, Sanofi-Aventis Deutschland GmbH, Frankfurt am Main), 30 Minuten nach SAB.
- Minozyklin-Gruppe (n=10): Einmalige, intraperitoneale Gabe von 45 mg pro Kg Körpergewicht Minozyklin (Minocycline hydrochloride, Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germany), 30 Minuten nach SAB.
- Kontrollgruppe (n=11): Einmalige, intraperitoneale Gabe von 1 ml pro Kg Körpergewicht Sterofundin Iso (B.Braun, Melsungen, Deutschland), 30 Minuten nach SAB

Während der dreistündigen Messphase wurden stündlich Blutgase abgenommen und alle anderen physiologischen Parameter engmaschig kontrolliert.

Nach Ablauf der drei Stunden wurden alle Sonden und der Schwanzkatheter entfernt und alle Operationswunden versorgt und geschlossen. Anschließend wurde die Narkose langsam ausgeleitet und die Ratte bei ausreichender Spontanatmung extubiert. Zur ausreichenden Analgesie wurde allen Tieren 40 mg/kg KG Metamizol (Novaminsulfon®- ratiopharm, Ratiopharm, Ulm, Deutschland) i.p. verabreicht. Abbildung 9 zeigt eine Übersicht über den zeitlichen Ablauf der Versuche.

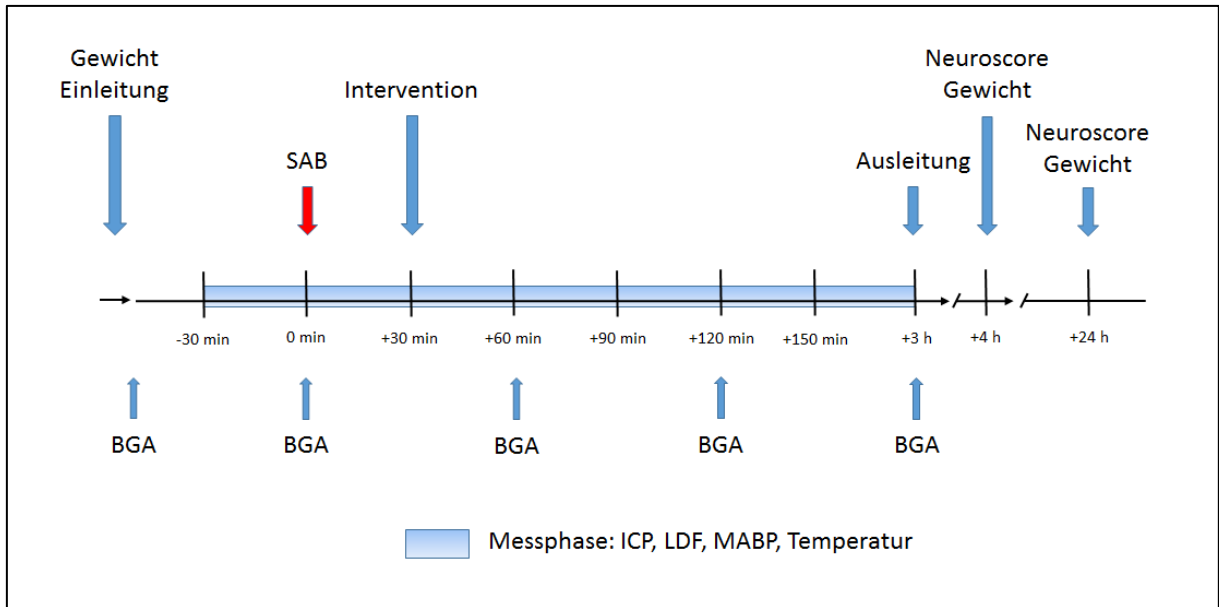


Abb. 9: Übersicht über den zeitlichen Verlauf der Versuche. (SAB = Subarachnoidalblutung, BGA = Blutgasanalyse, ICP = intrakranieller Druck, LDF = Laser-Doppler-Flowmetrie, MABP = mittlerer arterieller Blutdruck). Eigene Abbildung.

## 9. Neurologische Nachuntersuchungen

Die neurologischen Untersuchungen erfolgten 4 und 24 Stunden nach dem Auslösen der SAB. Für die Evaluation der neurologischen Beeinträchtigung wurden die Spontanaktivität der Versuchstiere und das Vorhandensein einer Hemiparese untersucht.

Als erstes wurde die allgemeine Aktivität der Ratte getestet und in einem 5-Stufen Aktivitätsscore eingeordnet (Normale Spontanreaktion (4) – Tod (0), s. Abb. 10). Hierzu wurden die Tiere in einem leeren Käfig ausgesetzt und nach einer mehrminütigen Akklimatisierungsphase beobachtet in welcher Zeit und in welcher Form sie die Seiten des Käfigs abliefen. Dies erfolgte an Hand eines modifizierten Beobachtungsprotokolls nach Garcia et al. [81].

Als zweites wurde auf das Vorhandensein einer Hemiparese getestet. Dafür wurde die Ratte am Schwanz aus dem Käfig gehoben und langsam, mit den Vorderpfoten zuerst, auf einen ebenen Untergrund gesetzt.

<b>Aktivitätsscore</b>	<b>Punkte</b>
<b>Normale Spontanaktivität</b>	4
<b>Verminderte Spontanaktivität</b>	3
<b>Aktivität nach Manipulation</b>	2
<b>Keine Aktivität</b>	1
<b>Tod</b>	0

Abb. 10: Punktwert der neurologischen Untersuchung

### 10. Auswertung der aufgezeichneten Hirndruck-, Blutdruck- und zerebralen Blutfluss-Messwerte:

Die aufgezeichneten Hirndruck-, Blutdruck- und zerebralen Blutfluss-Messwerte der Versuchsgruppen wurden zu 13 definierten Zeitpunkten miteinander verglichen: Jeweils vier Messwerte vor dem Auslösen der SAB, davon ein Wert unmittelbar davor als Referenzwert für die vorausgehenden und nachfolgenden Messwerte und neun Werte aus der sich anschließenden dreistündigen Nachbeatmungsphase (s. Abb. 11).

Um den Fehler durch Schwankungen in den Messkurven zu verkleinern, wurde mit Hilfe der „Map“-Funktion der Chart-Software ein Mittelwert aus den Messwerten in einem Intervall von 20 Sekunden um den jeweiligen Messzeitpunkt gebildet. Bei einer Messfrequenz von 2 Hz, ergab dieses Verfahren einen Mittelwert aus 40 einzelnen Messpunkten.

<b>Zeitpunkte: (Minuten)</b>	<b>-30</b>	<b>-20</b>	<b>-10</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>5</b>	<b>15</b>	<b>30</b>	<b>60</b>	<b>90</b>	<b>120</b>	<b>150</b>	<b>180</b>

Abb. 11: Zeitpunkte des Messwertvergleichs

Der zerebrale Perfusionsdruck („Cerebral Perfusion Pressure“, CPP) wurde aus der Differenz von MABP und ICP errechnet ( $CPP = MABP - ICP$ ). Die Auswertung der Messwerte MABP, ICP, CPP erfolgte als absolute numerische Werte. Die Auswertung des LCBF erfolgte als relativer Prozentwert zum unmittelbar vor der SAB erhobenen Referenzwert.

## 11. Histologiegewinnung

Die Gehirne der nach 24-Stunden noch lebenden Versuchstiere wurden für die Anfertigung von Kryoschnitten und Immunhistologie transkardial perfundiert und entnommen. Die Narkoseeinleitung erfolgte erneut mit Isofluran. Anschließend wurden den Ratten 50mg Natrium-Thiopental intraperitoneal verabreicht. Nach Wirkungseintritt der Narkose konnte der Thorax eröffnet werden. Über den Herzapex wurde eine abgestumpfte Kanüle in die Aorta ascendens vorgeschoben und mit einer atraumatischen Klemme fixiert. Über die Kanüle wurde das Tier für ca. 20 Minuten mit 4%iger Paraformaldehyd- Lösung perfundiert. Um einen Abfluss des Blutes und der Lösung zu gewährleisten wurde das rechte Herzohr inzidiert.

Das perfundierte Gehirn wurde nun entnommen und für 24-Stunden in Formalinlösung fixiert. Um einen ausreichenden Kälteschutz vor dem Tieffrieren der Gehirne zu erreichen, wurden die Gewebe für ca. drei Tage in eine 30%ige Saccharose-Lösung eingelegt, bis sie auf den Boden des Behälters absanken. Anschließend wurden die Gehirne in einer Schale mit Isopentan (2 Methylbutan, Carl Roth GmbH und Co Kg, Karlsruhe, Deutschland) in Trockeneis tiefgefroren und in einem Gefrierfach bei -20°C gelagert.

## 12. Bestimmung des Schweregrads der SAB

Bevor das perfundierte Gehirn in Formalinlösung eingelegt wurde, wurde der Grad der SAB bestimmt. Hierzu diente die Klassifikation nach Sugawara et al. In dieser Klassifikation wird unter dem Op- Mikroskop die Basalzisterne in sechs Quadranten unterteilt. Jedem Quadranten wird je nach Ausprägung und Vorhandensein von Blutgerinnseln ein Punktwert von null bis drei zugeteilt. So ergibt sich für die Schwere der SAB ein Gesamtpunktwert von 0 – 18. Der Gesamtpunktwert erlaubt wiederum eine Einteilung in eine milde (0 – 7), moderate (8 – 12) und schwere (13 – 18) SAB (s. Abb. 12). [82]

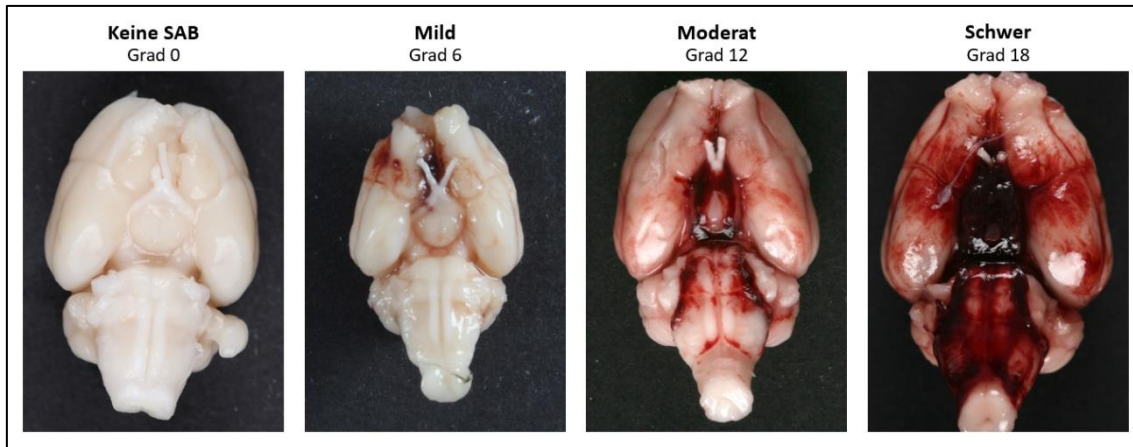


Abb. 12: Bestimmung des Schweregrads der Subarachnoidalblutung (SAB) anhand des Scores nach Sugawara et al [82]: Abhängig der Blutmenge in den sechs Quadranten der Basalzisterne wird ein Punktwert von 0-18 vergeben. Dieser erlaubt die Klassifizierung der SAB als mild, moderat oder schwer. Eigene Abbildung.

### 13. Histologische Färbungen

Von den tiefgefrorenen Gehirnen wurden mit einem Kryomikrotom (Leica CM3050s, Leica Mikrosystems Nussloch GmbH, Heidelberg, Deutschland), in koronarer Schnitfführung, 16µm dicke Schnitte angefertigt.

Pro Tier wurden jeweils zwei Gefrierschnitte immunhistochemisch gefärbt. Dazu wurden die Schnitte in einer Lösung aus 10%igem Pferde Serum (Normal Horse Serum, Jackson Immuno Research Laboratories, Inc., Suffolk, UK) und Phosphat-gepufferter-Salzlösung (PBS) für eine Stunde geblockt. Anschließend wurde der primäre Caspase-3 Antikörper (Cleaved Caspase-3 (Asp175) Antibody, 1:600, Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, Massachusetts, USA) aufgetragen und über Nacht bei 4°C inkubiert.

Als nächstes wurden die Schnitte in PBS gewaschen und der sekundäre Antikörper (Cy3 conjugate goat and rabbit IgG, Jackson Immunoresearch Laboratories Inc. Suffolk, UK) appliziert und für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einer erneuten Waschung in PBS wurde zur Darstellung aller Zellkerne zusätzlich eine DAPI-Farbmischung (4',6-Diamidino-2-phenylindole, Sigma- Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) aufgetragen.

## 14. Quantitative Histologie

Zur Quantifizierung apoptotischer (Caspase-3 positiver) Zellen wurde bei den Schnitten beidseits die CA1-Region des Hippocampus (nach Paxinos and Watson 2005, The rat brain in stereotaxic coordinates) untersucht. Die Schnitte wurden unter einem Fluoreszenzmikroskop (Leica DMI 3000B, Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland) in 40-facher Vergrößerung eingestellt und mit einer angeschlossenen Kamera abfotografiert (Ausschnitt 0,2x0,3 mm).

Auf den gespeicherten Bildern wurden mit der Bildbearbeitungssoftware Image J (Image J 1.49v, Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA) der Hintergrund herausgefiltert und ein geeigneter Kontrast eingestellt (s. Abb. 13). Anschließend wurden mit Hilfe der „cell counter“- Funktion des Programmes, die Caspase-3 positiven Zellen und die Gesamtanzahl der Zellkerne ausgezählt und ins Verhältnis gebracht. Die Auszählung erfolgte verblindet.

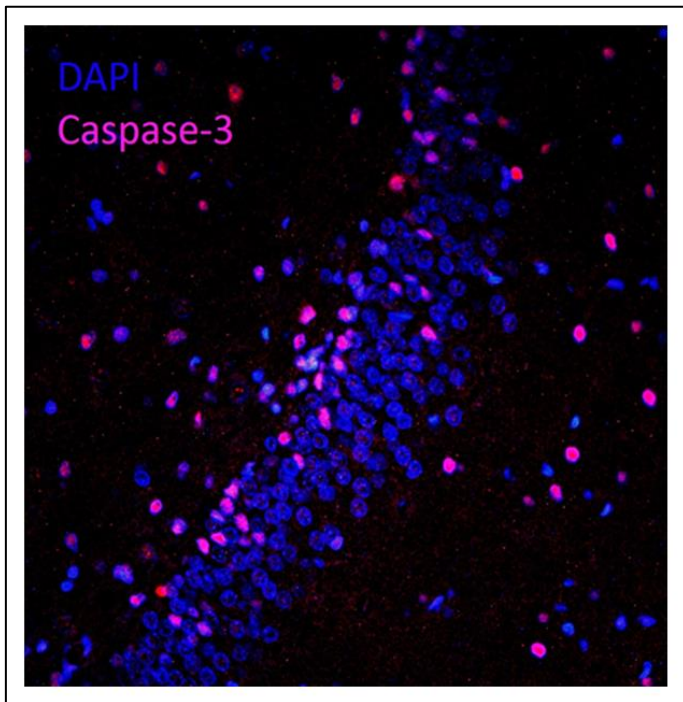


Abb. 13: Rattengehirn mit Caspase3- und DAPI-Färbung, CA1- Region, 40-fache Vergrößerung: Alle Zellkerne sind blau angefärbt (DAPI). Caspase-3-positive Zellen leuchten rosa. Eigene Abbildung.



## 15. Angaben zur statistischen Auswertung

Die statistischen Analysen wurden mit der Software GraphPad Prism (Version 4.03 für Windows, GraphPad Software, San Diego, Kalifornien, USA) durchgeführt.

Zur Signifikanztestung zwischen den Versuchsgruppen wurde für die physiologischen Parameter des Versuchs, sowie für die Ergebnisse der Immunhistochemie, eine Varianzanalyse (one-way ANOVA) angewendet. Soweit Mehrfachvergleiche notwendig waren, wurden diese mit dem Tukey-Test (inkl. Bonferroni-Korrektur) durchgeführt. Die ordinalen Werte der neurologischen Untersuchungen und die Punktwerte zur Quantifizierung der SAB wurden mit Hilfe des Kruskal-Wallis-Tests auf signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen überprüft.

Die Differenzen in der Mortalität der Gruppen wurden mit Hilfe des Chi<sup>2</sup>- Tests auf Signifikanz untersucht. Unterschiede wurden generell bei  $p < 0,05$  als signifikant eingestuft. Soweit nicht anders ausgewiesen, sind die Daten im Ergebnisteil als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler angegeben.

## E. Datenanalyse / Ergebnisse

### 1. Gewicht

Insgesamt zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen dem Gewicht präoperativ und 4 Stunden nach SAB (gepaarter T- Test,  $P < 0,0001$ ) mit einer durchschnittlichen Gewichtsabnahme von  $1,6 \pm 1,3$  % des Körpergewichts. Der Unterschied zwischen dem Ausgangsgewicht und dem Gewicht 24 Stunden nach SAB war ebenfalls hochsignifikant (gepaarter T- Test,  $P < 0,0001$ ) mit einer durchschnittlichen Gewichtsabnahme von  $14,4 \pm 3,2$  % des Körpergewichts (s. Abb. 14).

	<b>Präoperativ</b>	<b>4 h nach SAB</b>	<b>24 h nach SAB</b>
<b>Gewicht / g</b>	$352,2 \pm 48,3$	$346,5 \pm 46,3$	$283,3 \pm 25,5$
<b>Verlust / %</b>	-	$1,6 \pm 1,3$ %	$14,4 \pm 3,2$
<b>p</b>	-	$< 0,0001$	$< 0,0001$

Abb. 14: Durchschnittliches Gewicht und Gewichtsverlust in % des Ausgangsgewichts präoperativ, 4 Stunden und 24 Stunden nach Subarachnoidalblutung (SAB).

Die Gewichtsunterschiede zwischen den einzelnen Versuchsgruppen präoperativ, 4 Stunden und 24 Stunden nach SAB waren nicht signifikant (one-way ANOVA bzw. Kruskal-Wallis-Test,  $p > 0,05$ , s. Abb 15)

	<b>Methylpred.</b>	<b>Minozyklin</b>	<b>Kontrollen</b>	<b>p</b>
<b>Gewicht/g</b>	$350,0 \pm 50,3$	$367,0 \pm 57,5$	$340,8 \pm 40,3$	0,485
<b>Verlust 4h/%</b>	$2,3 \pm 1,7$	$0,8 \pm 0,7$	$1,5 \pm 1,1$	0,061
<b>Verlust 24h/%</b>	$16,2 \pm 3,2$	$13,5 \pm 2,0$	$12,9 \pm 3,3$	0,210

Abb. 15: Gewicht der Versuchstiere vor OP- Beginn und der Gewichtsverlust 4 Stunden und 24 Stunden nach Subarachnoidalblutung (SAB) in % des Ausgangsgewichts. (Methylpred. = Methylprednisolon).

## 2. Blutgase

### 5.1 pH-Wert

Die gemessenen pH-Werte ergaben zu keiner Zeit signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchsgruppen (one-way ANOVA, s. Abb. 16).

<b>pH</b>	<b>Methylpred.</b>	<b>Minozyklin</b>	<b>Kontrollen</b>	<b>p</b>
<b>-30 Min.</b>	7,47 ± 0,04	7,42 ± 0,07	7,40 ± 0,05	0,058
<b>0 Min.</b>	7,37 ± 0,05	7,40 ± 0,05	7,39 ± 0,06	0,343
<b>60 Min.</b>	7,33 ± 0,05	7,36 ± 0,06	7,38 ± 0,06	0,319
<b>120 Min.</b>	7,38 ± 0,04	7,36 ± 0,05	7,38 ± 0,05	0,556
<b>180 Min.</b>	7,36 ± 0,06	7,37 ± 0,05	7,38 ± 0,03	0,580

Abb. 16: Durchschnittliche pH – Werte der Versuchsgruppen im Versuchsverlauf. (Methylpred. = Methylprednisolon).

### 5.2 Sauerstoffpartialdruck (pO<sub>2</sub>)

Die Unterschiede der Sauerstoffpartialdrücke zwischen den Versuchsgruppen erreichten nicht das Signifikanzniveau von  $p < 0,05$  (one-way ANOVA, s. Abb. 17)).

<b>pO<sub>2</sub>/mmHg</b>	<b>Methylpred.</b>	<b>Minozyklin</b>	<b>Kontrollen</b>	<b>p</b>
<b>-30 Min.</b>	166,6 ± 26,0	149,2 ± 30,8	139,0 ± 17,0	0,081
<b>0 Min.</b>	144,4 ± 24,5	132,5 ± 20,1	139,0 ± 21,0±	0,609
<b>60 Min.</b>	125,5 ± 27,8	118,9 ± 20,7	126,7 ± 25,7	0,776
<b>120 Min.</b>	115,6 ± 24,9	108,8 ± 21,4	116,0 ± 18,2	0,563
<b>180 Min.</b>	119,9 ± 22,3	104,0 ± 23,2	101,4 ± 16,2	0,234

Abb. 17: Durchschnittliche Sauerstoffpartialdruck (pO<sub>2</sub>)- Werte der Versuchsgruppen im Versuchsverlauf. (Methylpred. = Methylprednisolon)

### 5.3 Kohlenstoffdioxidpartialdruck (pCO<sub>2</sub>)

Eine halbe Stunde vor SAB zeigten sich die Kohlenstoffdioxidpartialdrücke der Methylprednisolongruppe signifikant niedriger als die Drücke der Kontrollgruppe (Kruskal-Wallis-Test:  $p = 0,017$ , Dunn's Post-hoc Test inklusive Bonferroni-Korrektur,  $p = 0,005$ ). Im weiteren Verlauf der Versuche ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen (s. Abb. 18).

pCO <sub>2</sub> /mmHg	Methylpred.	Minozyklin	Kontrollen	p
<b>-30 Min.</b>	32,2 ± 4,4	41,4 ± 11,3	44,5 ± 8,1	0,017
<b>0 Min.</b>	39,7 ± 4,6	36,3 ± 8,8	44,5 ± 5,9	0,058
<b>60 Min.</b>	42,7 ± 5,6	40,1 ± 5,3	43,1 ± 8,7	0,594
<b>120 Min.</b>	40,7 ± 5,6	41,4 ± 3,2	43,1 ± 6,3	0,649
<b>180 Min.</b>	41,7 ± 4,8	41,0 ± 6,3	44,1 ± 4,4	0,567

Abb. 18: Durchschnittliche Kohlenstoffdioxidpartialdruck (pCO<sub>2</sub>)- Werte der Versuchsgruppen im Versuchsverlauf. (Methylpred. = Methylprednisolon)

### 3. Mittlerer arterieller Blutdruck (MABP)

Vor dem Auslösen der SAB zeigten die Versuchstiere der Kontrollgruppe einen MABP von durchschnittlich  $74 \pm 25$  mmHg. Ratten der Methylprednisolongruppe hatten einen durchschnittlichen MABP  $68 \pm 8$  mmHg und Ratten der Minozyklingruppe einen MABP von  $71 \pm 19$  mmHg. Im Anschluss an die SAB fiel ein milder Cushingreflex (Blutdruckanstieg als Reaktion auf den plötzlichen Hirndruckanstieg) bei der Kontrollgruppe auf. Dieser erreichte Werte von  $81 \pm 20$  mmHg und  $84 \pm 21$  mmHg nach 4 bzw. 60 Minuten. In den Versuchsgruppen mit Pharmakointervention blieben die Blutdruckwerte bei ca. 70 mmHg konstant, ohne dass ein deutlicher MABP- Anstieg aufgezeichnet werden konnte. Die Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen erreichten allerdings zu keiner Zeit des Versuchsverlaufs das Signifikanzniveau (one-way ANOVA,  $p > 0,05$ , s. Abb. 19).

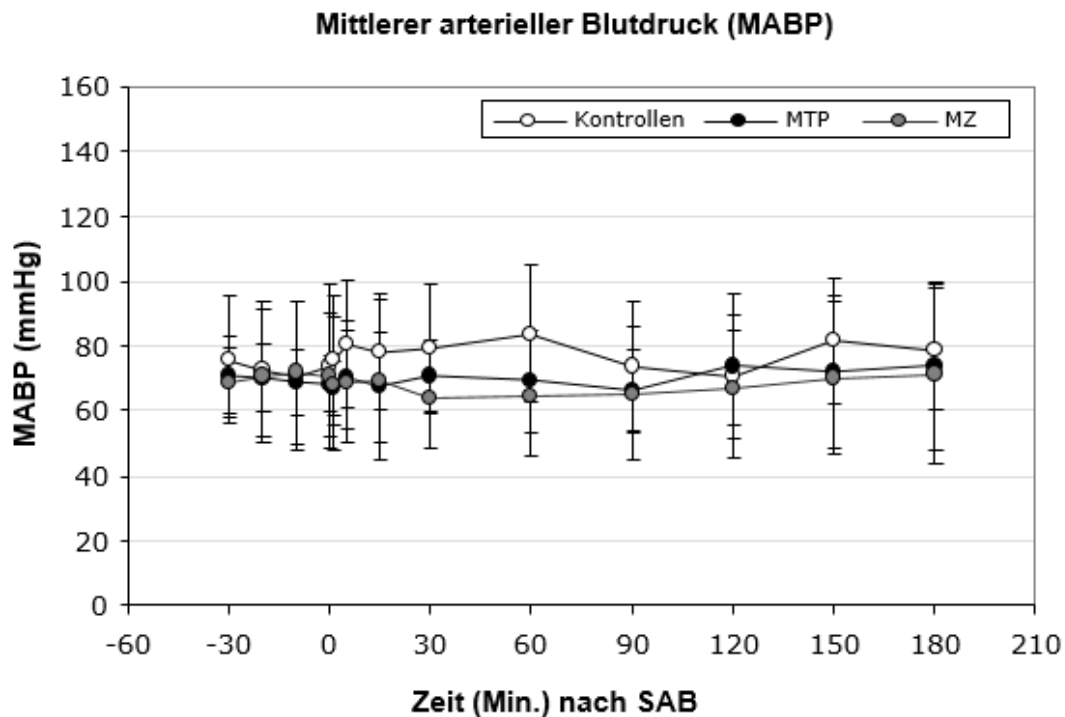


Abb. 19: Verlauf des kontinuierlich gemessenen mittleren arteriellen Blutdrucks (MABP). Die SAB wurde bei 0 Minuten ausgelöst. Die Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen erreichten zu keiner Zeit des Versuchsverlaufes das Signifikanzniveau. (SAB = Subarachnoidalblutung, MTP = Methylprednisolon, MZ = Minozyklin).

#### 4. Intrakranieller Druck (ICP)

Vor dem Auslösen der SAB zeigten sich keine signifikanten Unterschiede im intrakraniellen Druck zwischen den vier Versuchsgruppen (one-way ANOVA:  $p > 0,05$  30 Minuten, 20 Minuten und 10 Minuten vor SAB). In der Kontrollgruppe stieg der durchschnittliche ICP bis auf ein Maximum von  $27 \pm 17$  mmHg 15 Minuten nach SAB, um sich anschließend langsam den Ausgangswerten an zu nähern.

Bei Tieren der Methylprednisolongruppe stieg der mittlere ICP auf ein Maximum von  $30 \pm 17$  mmHg unmittelbar nach SAB an. Die Werte normalisierten bis auf einen durchschnittlichen Wert von  $15 \pm 8$  mmHg am Ende der Messphase. In der Minozyklingruppe stieg der ICP auf  $29 \pm 8$  mmHg 15 Minuten nach dem Auslösen der SAB und erreichte einen durchschnittlichen Wert von  $20 \pm 14$  mmHg am Ende der

dreistündigen Messphase. Eine halbe Stunde nach SAB zeigte sich ein signifikanter Unterschied im Kruskal-Wallis Test ( $p = 0,040$ ) zwischen den Versuchsgruppen. Die Post-hoc Analyse, inklusive Bonferroni-Korrektur, wies den Unterschied zwischen der Methylprednisolon und der Kontrollgruppe als signifikant an ( $p=0,039$ ). Während der übrigen Messphase ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen (s. Abb. 20).

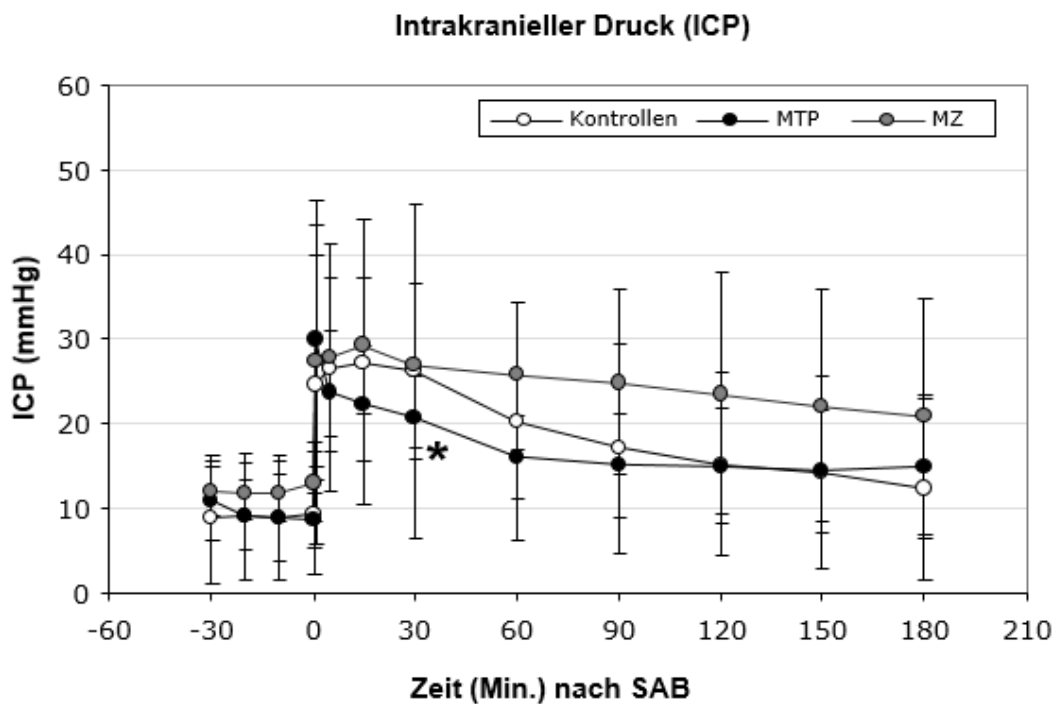


Abb. 20: Verlauf des kontinuierlich gemessenen intrakraniellen Drucks (ICP). Die SAB wurde bei 0 Minuten ausgelöst. 30 Minuten nach SAB wiesen die Tiere der Methylprednisolongruppe einen signifikant niedrigeren ICP als die Kontrolltiere auf. Im übrigen Versuchslauf ergaben sich keine signifikanten Unterschiede. (SAB = Subarachnoidalblutung, MTP = Methylprednisolon, MZ = Minozyklin, \* = Signifikanter Unterschied /  $p < 0,05$ ).

## 5. Zerebraler Perfusionsdruck (CPP)

Die Baseline-Werte des CPPs waren  $65 \pm 27$  mmHg,  $60 \pm 11$  mmHg und  $60 \pm 20$  mmHg für die Kontroll-, die Methylprednisolon- bzw. die Minozyklingruppe. Unmittelbar im Anschluss an die SAB fiel der CPP der Kontrollen auf  $49 \pm 26$  mmHg. Die Werte dieser Gruppe erreichten das Baselineniveau nach 60 Minuten und endeten bei  $67 \pm 23$  mmHg am Ende der Messphase. Ratten der Methylprednisolongruppe wiesen eine Abnahme des CPP auf einen Mittelwert von  $36 \pm 26$  mmHg auf. Im Verlauf der Messphase erholten sich die Werte bis auf durchschnittlich  $56 \pm 29$  mmHg. In der Minozyklingruppe fiel der CPP nach dem Auslösen der SAB auf einen Mittelwert von  $41 \pm 18$  mmHg. Im Anschluss erreichten die Werte am Ende der Messphase lediglich ein Niveau von  $47 \pm 33$  mmHg. Die Unterschiede im CPP der Kontroll-, Methylprednisolon- und Minozyklingruppe erreichten zu keiner Zeit des Versuches das Signifikanzniveau (one-way ANOVA,  $p > 0,05$ , s. Abb. 21).

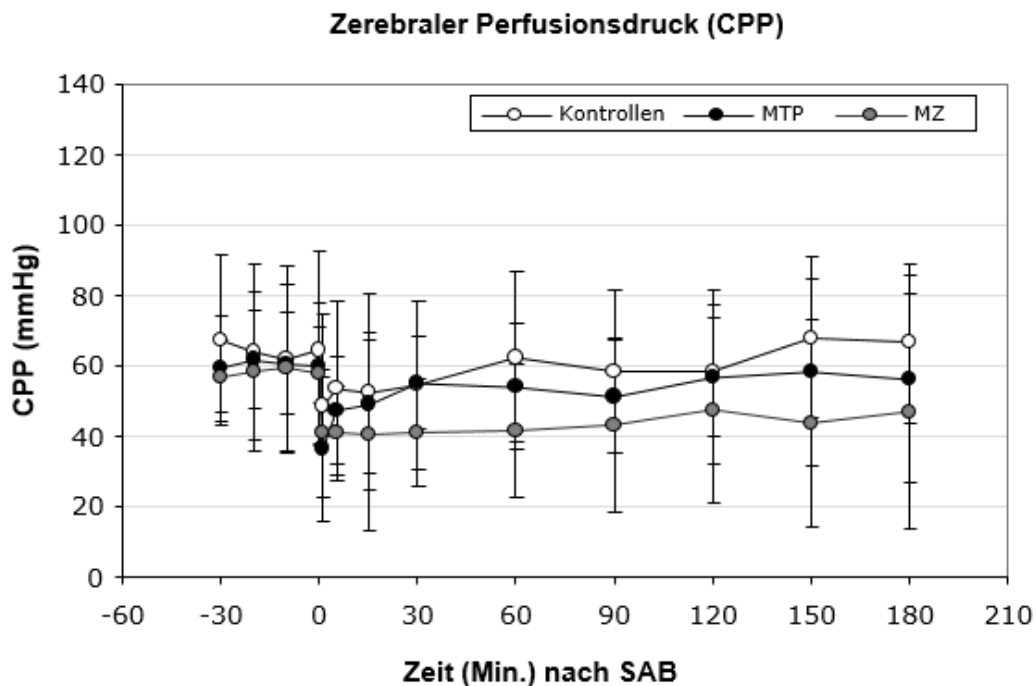


Abb. 21: Verlauf des zerebralen Perfusionsdrucks (CPP). Die SAB wurde bei 0 Minuten ausgelöst. Die Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen erreichten zu keiner Zeit des Versuches das Signifikanzniveau. (SAB = Subarachnoidalblutung, MTP = Methylprednisolon, MZ = Minozyklin).

## 6. Lokaler zerebraler Blutfluss (LZBF)

### 9.1 LZBF 1 (ipsilateral)

Vor der SAB zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den drei Versuchsgruppen im LZBF der ipsilateralen Seite (one-way ANOVA:  $p > 0,05$  30 Minuten, 20 Minuten und 10 Minuten vor SAB).

Nach dem Auslösen der SAB fiel der LZBF der Kontrolltiere auf ein Niveau von durchschnittlich  $27 \pm 20\%$  des Ausgangswertes (Baseline). Im Verlauf der Messphase verbesserte sich der ipsilaterale LZBF auf Werte zwischen 80 – 90 % der Baseline ( $84 \pm 48\%$  nach 3 Stunden). In der Methylprednisolongruppe fiel der mittlere LZBF auf ein Niveau von  $28 \pm 28\%$  der Baseline und verbesserte sich anschließend bis auf  $77 \pm 31\%$  des Ausgangswertes. Bei Ratten der Minozyklingruppe fiel der mittlere LZBF auf ein Niveau von  $18 \pm 10\%$  der Baseline und verbesserte sich anschließend bis auf  $68 \pm 34\%$  des Ausgangswertes.

Die Unterschiede im ipsilateralen LZBF der Kontroll-, Methylprednisolon- und Minozyklingruppe erreichten 60 Minuten nach SAB das Signifikanzniveau (one-way ANOVA,  $p = 0,036$ ). Die Post-hoc Analyse nach Tukey wies den Unterschied zwischen der Kontroll- und Minozyklingruppe als signifikant aus ( $p = 0,049$ , nach Bonferroni-Korrektur). Im übrigen Versuchsverlauf ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen (one-way ANOVA,  $p > 0,05$ , s. Abb. 22).



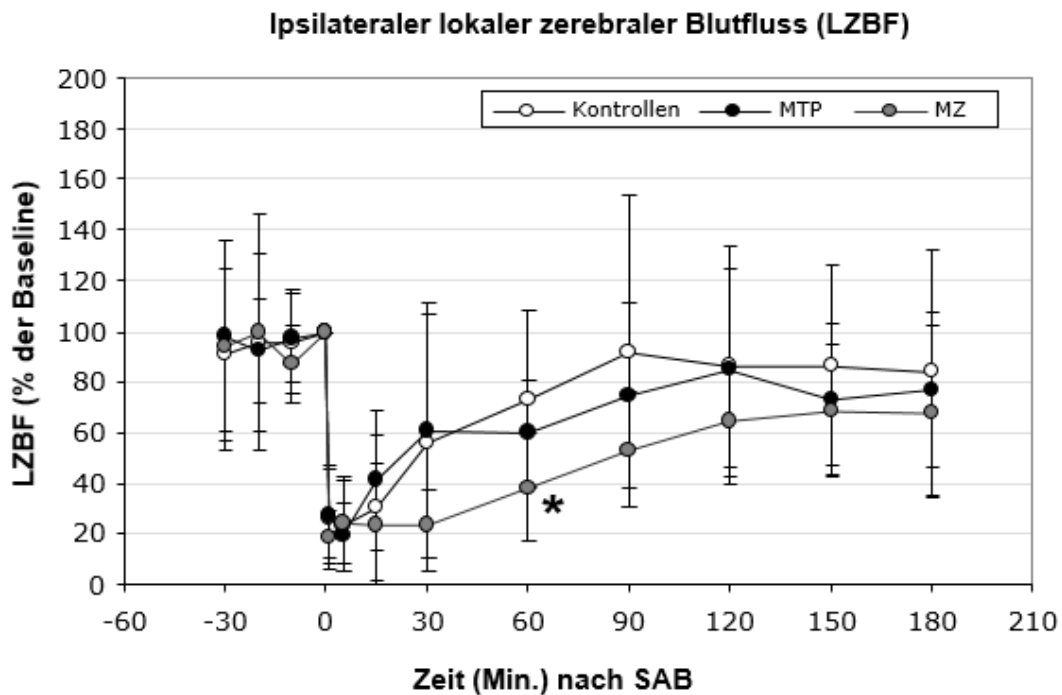


Abb. 22: Verlauf des kontinuierlich gemessenen ipsilateralen lokalen zerebralen Blutflusses (LZBF). Die SAB wurde bei 0 Minuten ausgelöst. 60 Minuten nach SAB wiesen die Tiere der Minozyklingruppe einen signifikant niedrigeren LZBF als die Kontrolltiere auf. Im übrigen Versuchslauf ergaben sich keine signifikanten Unterschiede. Die Werte sind als Relativwerte der Baseline dargestellt. (SAB = Subarachnoidalblutung, MTP = Methylprednisolon, MZ = Minozyklin, \* = Signifikanter Unterschied /  $p < 0,05$ ).

## 9.2 LDF 2 (kontralateral)

Vor dem Auslösen der SAB zeigten sich keine signifikanten Unterschiede im kontralateralen LZBF zwischen den drei Versuchsgruppen (one-way ANOVA:  $p > 0,05$  30 Minuten, 20 Minuten und 10 Minuten vor SAB).

Nach dem Auslösen der SAB fiel der LZBF der Kontrolltiere bis auf ein Niveau von durchschnittlich  $49 \pm 36\%$  des Ausgangswertes (Baseline). Im Verlauf der Messphase verbesserte sich der kontralaterale LZBF auf  $84 \pm 37\%$  nach 3 Stunden. In der Methylprednisolongruppe fiel der mittlere LZBF auf ein Niveau von  $43 \pm 36\%$  der Baseline und verbesserte sich anschließend bis auf  $79 \pm 26\%$  des Ausgangswertes. Bei Ratten der Minozyklingruppe fiel der mittlere LZBF auf ein Niveau von  $38 \pm 33\%$  der Baseline und verbesserte sich anschließend bis auf  $85 \pm 19\%$  des Ausgangswertes. Die

Unterschiede zwischen der Kontroll-, Methylprednisolon- und Minozyklingruppe erreichten zu keiner Zeit des Versuches das Signifikanzniveau von  $p < 0,05$  (s. Abb. 23).

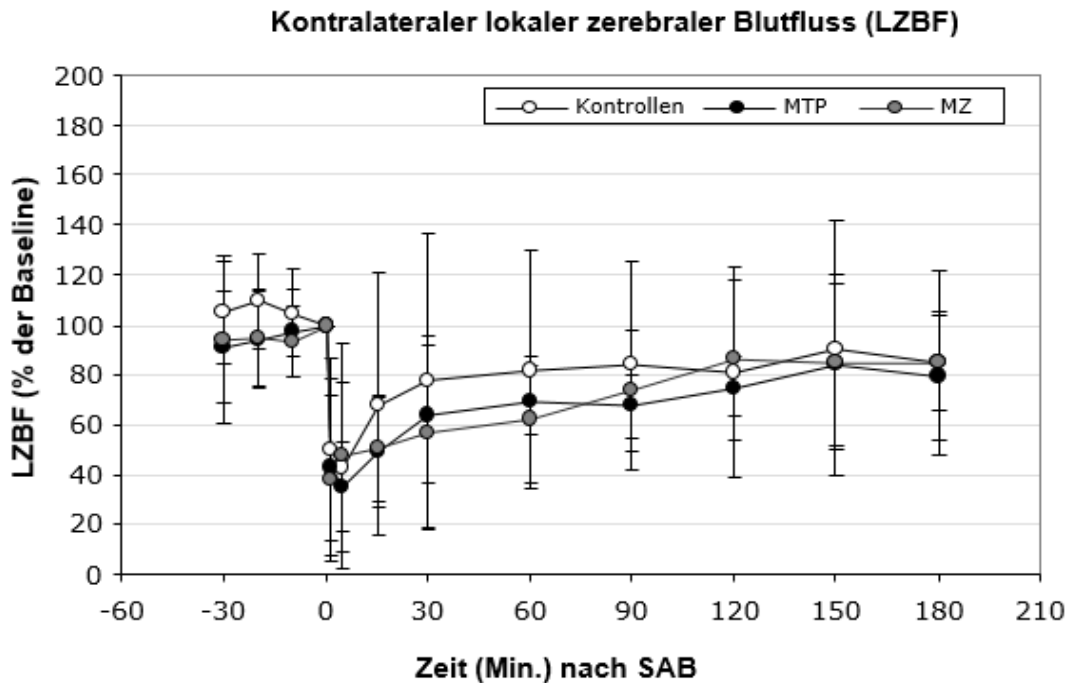


Abb. 23: Verlauf des kontinuierlich gemessenen kontralateralen lokalen zerebralen Blutflusses (LZBF). Die SAB wurde bei 0 Minuten ausgelöst. Im gesamten Versuchslauf ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen. Die Werte sind als Relativwerte der Baseline dargestellt. (SAB = Subarachnoidalblutung, MTP = Methylprednisolon, MZ = Minozyklin, \* = Signifikanter Unterschied /  $p < 0,05$ ).

## 7. Mortalität

Insgesamt wurde der Versuch bei 35 Ratten durchgeführt. Vier der Tiere verstarben bereits während der Narkoseeinleitung. Drei Ratten der Methylprednisolon- (MP), vier der Minozyklin- (MZ)- und sechs der Kontrollgruppe (KG) überlebten die ersten 24 Stunden nach dem Auslösen der SAB nicht (s. Abb. 24). Die Unterschiede in der Mortalität zwischen den Versuchsgruppen zeigten im  $\chi^2$ - Test keine signifikanten Unterschiede.

	<b>Methylpred.</b>	<b>Minozyklin</b>	<b>Kontrollen</b>	<b>p</b>
<b>Anzahl</b>	3 (n=10)	4 (n=10)	6 (n=11)	
<b>Anteil</b>	30 %	40 %	55 %	0,431

Abb. 24: Anzahl und Anteil der innerhalb der ersten 24 Stunden nach Subarachnoidalblutung verstorbenen Tiere pro Versuchsgruppe. Der Unterschied zwischen den Versuchsgruppen erwies sich als nicht signifikant. (Methylpred. = Methylprednisolon, n = Anzahl Versuchstiere).

## 8. Neurologische Nachuntersuchung

Tiere, die mit Methylprednisolon oder Minozyklin behandelt wurden, zeigten einen Trend zu besseren Werten im Aktivitätsscore. Die Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen waren aber weder 4 noch 24 Stunden nach SAB signifikant (4 Stunden:  $p = 0,550$ , 24 Stunden:  $p = 0,430$ , s. Abb. 25 und 26). Keines der überlebenden Versuchstiere wies Anzeichen für eine Hemiparese auf.

<b>Aktivität</b>	<b>Methylpred.</b>	<b>Minozyklin</b>	<b>Kontrollen</b>	<b>p</b>
<b>4 h</b>	$2,50 \pm 0,67$	$2,30 \pm 0,46$	$2,27 \pm 0,62$	0,550
<b>24 h</b>	$2,60 \pm 1,74$	$2,30 \pm 1,90$	$1,55 \pm 1,78$	0,430

Abb. 25: Aktivitätsscore 4 Stunden und 24 Stunden nach Subarachnoidalblutung pro Versuchsgruppe. Die Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen waren zu beiden Zeitpunkten nicht signifikant. (Methylpred. = Methylprednisolon).

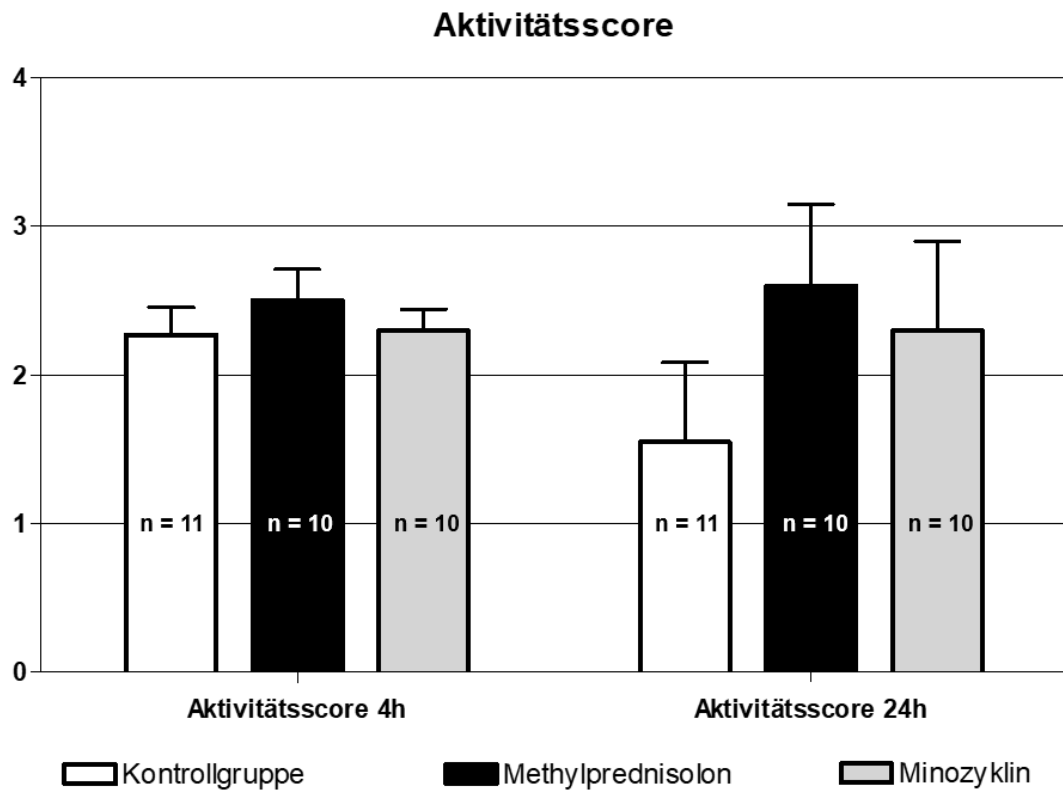


Abb. 26: Graph der neurologischen Untersuchung nach der 5-Punkt-Aktivitätsskala (0=tot, 4= normale Aktivität) 4 Stunden und 24 Stunden nach Subarachnoidalblutung. (n = Anzahl der Versuchstiere).

## 9. Ausmaß der SAB

Bei der Beurteilung des Ausmaßes der SAB wiesen alle Versuchstiere eine deutliche SAB auf. Ferner wurden keine Subduralhämatome oder Mediaokklusionen beobachtet. Der Score für das Ausmaß der SAB nach Sugawara et al. ergab für die Methylprednisolon- und die Kontrollgruppe jeweils Werte, die einer „moderaten“ Blutung entsprechen ( $10,00 \pm 3,03$  bzw.  $8,27 \pm 2,83$ ). Die Subarachnoidalblutungen der Minozyklin- Tiere sind hingegen im Schnitt als „mild“ eingestuft worden ( $7,40 \pm 2,69$ ). Die Unterschiede zeigten sich im Kruskal-Wallis-Test aber nicht als signifikant ( $p=0,161$ , s. Abb. 27).

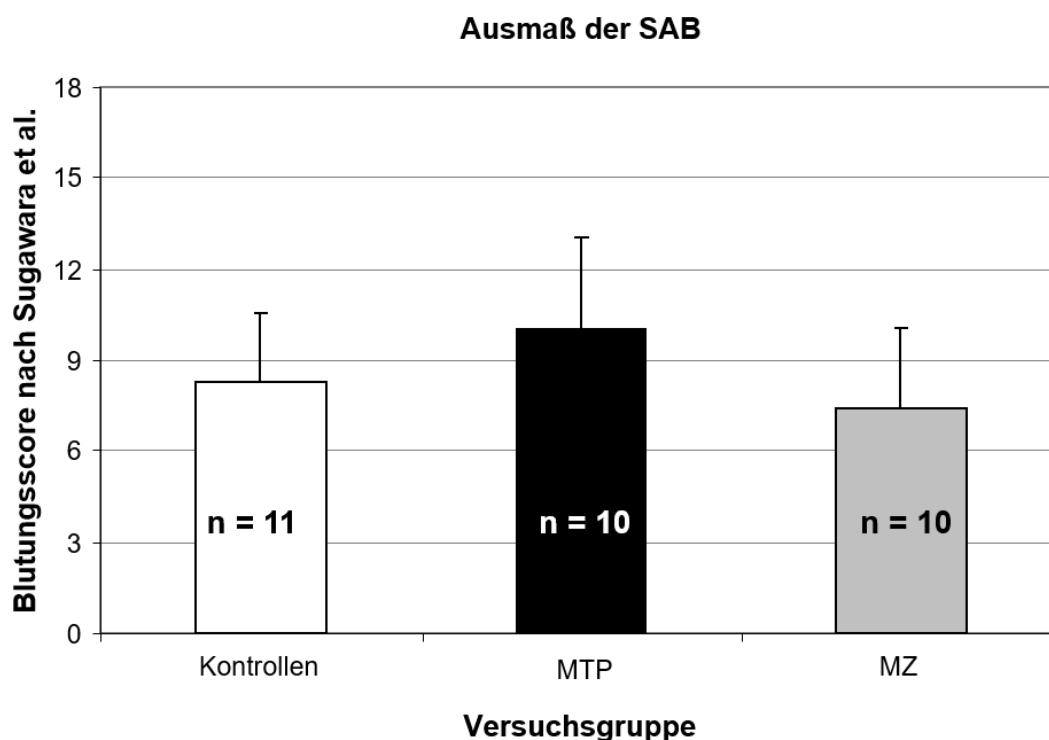


Abb. 27: Ausmaß der Subarachnoidalblutung (SAB), bestimmt mit Hilfe der semiquantitativen Klassifikation nach Sugawara et al. Die Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen sind nicht signifikant. (MTP = Methylprednisolon, MZ = Minozyklin, n = Anzahl der Versuchstiere).

### 10. Immunhistochemie (Caspase3)

Der Anteil Caspase 3 positiver Zellen zeigte sich vermindert in den beiden Interventionsgruppen (MTP: 4,4%  $\pm$  3,3, MZ: 4,4%  $\pm$  4,0) im Vergleich zur Kontrollgruppe (9,6%  $\pm$  10,7). Mittels one-way ANOVA ließen sich die Unterschiede als signifikant nachweisen. Der Post-hoc-Test nach Tukey bestätigte, dass sowohl der Unterschied zwischen der Methylprednisolongruppe und der Kontrollgruppe, als auch der Unterschied zwischen der Minozyklin- und der Kontrollgruppe, signifikant sind (s. Abb. 28).

### Neuronaler Zellschaden nach 24 Stunden (überlebende Tiere)

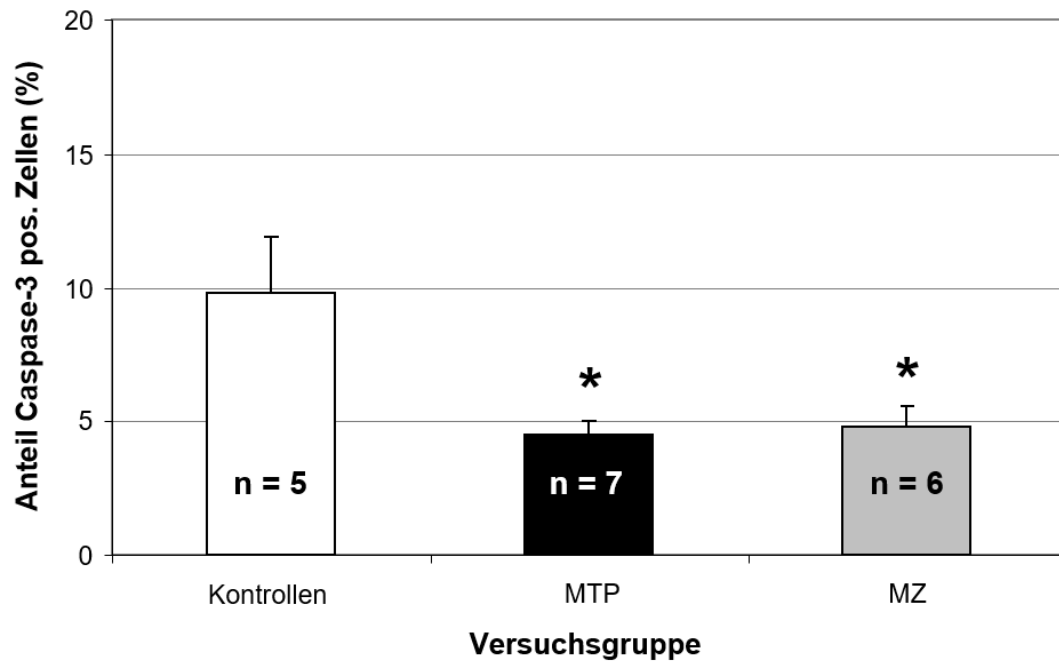


Abb. 28: Anteil der Caspase-3 positiven Zellen an der Gesamtanzahl der Neurone pro Bildausschnitt (40-fache Vergrößerung). Beide Interventionsgruppen zeigen einen signifikant niedrigeren Anteil Caspase-3 positiver Zellen im Vergleich zur Kontrollgruppe. (MTP = Methylprednisolon, MZ = Minozyklin, n = Anzahl der Versuchstiere, \* = Signifikanter Unterschied /  $p < 0,05$ )

## **F. Diskussion**

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie zeigen, dass sowohl Methylprednisolon als auch Minozyklin die Anzahl Caspase 3 positiver Zellen im Hippocampus, 24 Stunden nach SAB, signifikant reduzieren. Das deutet darauf hin, dass beide Arzneimittel den Hirnschaden im Rahmen der „Early Brain Injury“ vermindern.

Während der dreistündigen Messphase direkt im Anschluss an die SAB hatte die Therapie mit Methylprednisolon und Minozyklin keine signifikanten Verbesserungen des zerebralen Blutflusses und des Hirndrucks zur Folge. Außerdem konnte kein positiver Effekt der Therapie mit Minozyklin oder Methylprednisolon auf das neurologische Outcome der Versuchstiere beobachtet werden.

Daher muss die Hypothese, dass die getesteten anti-inflammatorischen Wirkstoffe die Gehirndurchblutung stabilisieren und die neurologische Symptomatik der Versuchstiere frühzeitig verbessern nach den hiesigen Ergebnissen abgelehnt werden.

### 1. Das endovaskuläre Perforationsmodell

In der vorliegenden Arbeit wurde das endovaskuläre Perforationsmodell (Fadenmodell) nach Bederson et al. [3] zur Simulation einer akuten SAB am Rattenmodell angewendet. Wie im Methodenteil beschrieben wird hierbei mit Hilfe eines monofilen Fadens, der über die A. carotis interna bis an den Circulus arteriosus Willisi vorgeschoben wird, eine Ruptur eines arteriellen Gefäßes induziert. Die Mortalität und Morbidität bei diesem Eingriff sind hoch (Mortalität bis zu 50%). Das entspricht in etwa der Mortalität der menschlichen Patientenpopulation mit einer schweren SAB [83]. Eine weitere Eigenschaft dieses Modells ist die Tatsache, dass sich das Blutvolumen im Subarachnoidalraum und damit der Schweregrad der SAB heterogen ist und sich nur schwer kontrollieren lässt [84].

Das endovaskuläre Perforationsmodell wurde in einer Vielzahl experimenteller Studien angewendet und gilt als hinreichend etabliert [3, 84-86]. Auch in der eigenen

Arbeitsgruppe wurde mit diesem Modell bereits seit vielen Jahren eine große Anzahl an Versuchsreihen durchgeführt, so dass es hier mit viel Erfahrung und hochstandardisiert gehandhabt wird.

Als Alternative wird in vielen Studien das sogenannte „Doppel-Injektionsmodell“ verwendet. Dabei wird autologes Blut in die Cisterna magna injiziert. Dieses Modell hat den Vorteil, dass sich durch die Menge an injiziertem Blut das Ausmaß der SAB sehr gut einstellen und reproduzieren lässt. Außerdem ist das Experiment technisch leichter durchführbar und die Mortalität der Versuchstiere geringer [86, 87].

Allerdings ziehen Lee et al. in einem Vergleich der beiden Verfahren die Schlussfolgerung, dass das endovaskuläre Perforationsmodell das geeignetste Modell ist um insbesondere die pathophysiologischen Veränderungen in der Frühphase der SAB, also der EBI beim Menschen tierexperimentell zu stimulieren, weil die SAB hier durch direkten Blutaustritt aus einem perforierten Blutgefäß ausgelöst und somit eine Gehirnläsion unter arteriellen Blutdruckverhältnissen verursacht wird [83].

Insbesondere weil es das Ziel dieser Versuchsreihe war, die mögliche neuroprotektive Wirksamkeit der getesteten Medikamente in der Akutphase der SAB zu untersuchen wurde das Fadenmodell dem Injektionsmodell vorgezogen.

Um das Ausmaß der SAB dabei möglichst genau zu reproduzieren und den Schaden am Gehirnparenchym durch den Faden zu minimieren, wurde darauf geachtet stets die gleiche Sorte monophilen Faden in der gleichen Länge zu gebrauchen, auf mehrfache Perforation des Gefäßes durch den Faden zu verzichten und nach gefühlter Gefäßperforation den Faden lediglich 2mm weiter vorzuschieben. Um eine sofortige und komplette Reperfusion des perforierten Gefäßes zu ermöglichen, wurde der Faden nach erfolgter einmaliger Perforation sofort zurückgezogen. Dadurch erhöht sich zwar die Mortalitätsrate [88], aber auch die Reproduzierbarkeit des Blutungsausmaßes, und damit die Standardisierung des Modells.



## 2. Auswahl der Arzneimittel, Dosierung und Zeitpunkt der Applikation

Die komplexen Pathomechanismen, die sich im Rahmen der frühen Hirnschädigung nach einer Subarachnoidalblutung abspielen, bieten eine Vielzahl verschiedener Ansatzmöglichkeiten für eine erfolgreiche Therapie [89]. So konnte unter anderem gezeigt werden, dass extravasales Hämoglobin, die beschädigte Endothelbarriere und freie Sauerstoffradikale aus zerfallenen Leukozyten und Erythrozyten eine unkontrollierte Entzündungsreaktion in Gang setzen, die über die Einwanderung von Leukozyten und Makrophagen und Aktivierung von verschiedenen Immunreaktionen letztendlich zu unkontrollierter Apoptose und Nekrose führt [90-92].

Obwohl sich die Kenntnis der unzähligen Einflussfaktoren und Signalkaskaden der „Early Brain Injury“ (EBI) rasch ausweitet, haben sich bisher noch keine frühen neuroprotektiven Therapien etabliert. Da inflammatorische Vorgänge eine große Rolle in der Entstehung der EBI zu spielen scheinen [54], hat sich diese Arbeit zum Ziel gesetzt den Einfluss der anti-inflammatorischen Medikamente Methylprednisolon und Minozyklin auf die frühe Phase nach experimenteller SAB zu untersuchen.

Methylprednisolon wurde schon früher zur Behandlung der Folgen einer SAB eingesetzt: Dabei ging es jedoch vor allem um das Verhindern von Vasospasmen und die Behandlung deren Folgen [58, 60, 61, 93]. In einer Metaanalyse aus dem Jahr 2005 konkludierten Feigin et al., dass es keine ausreichenden Daten gibt, die unterstützen, dass Corticosteroide einen günstigen Effekt auf den klinischen Verlauf nach einer SAB haben [94]. Allerdings gelang es Gomis und Kollegen in der Zwischenzeit in einer randomisierten und kontrollierten klinischen Studie zu zeigen, dass Patienten, die drei Tage lang mit 16mg/kg KG Methylprednisolon täglich behandelt wurden, ein Jahr nach SAB ein signifikant besseres klinisches Outcome aufwiesen als Patienten nach Placebo-Behandlung [64]. Czorlich et al. konnten diese Beobachtung für die Behandlung mit Dexamethason bei mikrochirurgisch am ursächlichen Aneurysma behandelten Patienten nach SAB bestätigen [95]

Methylprednisolon gehört zu den Glukokortikoiden. Im Vergleich zu Prednisolon und Hydrocortison hat es den Vorteil der zu vernachlässigenden mineralokortikoiden

Wirkung. Die Dosierung in der vorliegenden Studie (16mg/kg) ist in Anlehnung an die klinische Studie von Gomis et al. gewählt [64].

Methylprednisolon vermittelt eine Vielzahl an Wirkungen über den Glukokortikoidrezeptor. Zu den möglichen Wirkungen im Rahmen der frühen Hirnschädigung nach SAB zählen die Antagonisierung der Vasokonstriktion und das große anti-inflammatorische Potential, das unter anderem über die Hemmung des Nuklear-Faktors  $\kappa$ B vermittelt wird [56, 59]. Außerdem verringert das Glukokortikoid die Aktivität der Lipidperoxidase und reduziert dadurch den oxidativen Schaden und stabilisiert die Endothelbarriere [62].

Auch Minozyklin weist verschiedene neuroprotektive Eigenschaften auf, die es für die Therapie der EBI interessant erscheinen lassen. Das Tetrazyklin-Antibiotikum ist lipophil und kann daher problemlos die Blut-Hirnschranke passieren [66]. In experimentellen Modellen von verschiedenen neurologischen Erkrankungen konnte ein positiver Einfluss von Minozyklin auf apoptotische, inflammatorische und oxidative Signalwege nachgewiesen werden [67, 79, 96]. Schlüsselproteine für die Wirksamkeit von Minozyklin scheinen z.B. die Matrix-Metallo-Protease 9, der Tumor-Nekrosefaktor- $\alpha$  oder das Apoptose-assoziierte Cytochrom C zu sein [65, 70]

Der Effekt von Minozyklin auf das endovaskuläre Fadenmodell der SAB bei Ratten ist kürzlich durch zwei andere Arbeitsgruppen untersucht [72, 97]. Die Arbeitsgruppe um Sherchan und Kollegen verabreichte Minozyklin eine Stunde nach SAB entweder in einer niedrigen Dosierung (45mg/kg) oder einer hohen Dosierung (135mg/kg). Da die Gruppe der Versuchstiere mit der höheren Dosierung bessere Ergebnisse aufzeigte verwendeten Li et al. in ihrem Experiment lediglich die Dosierung von 135mg/kg.

Im Allgemeinen weisen Nagetiere einen höheren Lebermetabolismus auf als Menschen [65]. Das erklärt auch die kürzere Halbwertszeit von Minozyklin bei Nagern (2-3 Stunden versus ca. 15 Stunden beim Menschen) [66, 98]. Daher konkludieren Yong et al. in einer Übersichtsarbeit, dass viele Tierexperimente mit Minozyklin möglicherweise mit einer zu geringen Dosierung durchgeführt würden [65].

Dem gegenüber stehen die Ergebnisse von Matsukawa et al.: In einem experimentellen Model des Schlaganfalls bei Ratten wurde beobachtet, dass eine niedrige Dosierung von Minozyklin (20mg/kg) neuronalen Zelltod inhibierte, während Tiere die eine hohe Dosierung Minozyklin (100mg/kg) verabreicht bekamen sogar eine Zunahme des ischämischen Zellschadens aufwiesen [99]. Daher entschieden wir uns im vorliegenden Versuch mit einer Dosierung von 45mg/kg zu arbeiten.

Auf die gleichzeitige Anwendung von Methylprednisolon und Minozyklin wurde aufgrund des nicht zu erwartenden gemeinsamen Effekts verzichtet.

In unserem Versuch wurden die Medikamente bereits 30 Minuten nach SAB verabreicht. Es ist nicht bekannt in welchem Ausmaß so früh nach einer SAB bereits relevante inflammatorische Prozesse ablaufen. Friedrich et al. konnten zeigen, dass Apoptose- und Nekrosevorgänge bereits 10 Minuten nach SAB beginnen könnten [100]. Die akute Hirnschädigung scheint also extrem früh einzusetzen. Dies unterstreicht die Notwendigkeit einer frühen Therapie.

Die Medikamente und das Placebo der Kontrollgruppe (isotonische Kochsalzlösung) wurden den Versuchstieren unter Narkose intraperitoneal verabreicht. Eine Stressreaktion gefolgt von einem Cortisol-Peak wurde so weitestgehend ausgeschlossen. Allerdings stellten Nessler et al. die Hypothese auf, dass Minozyklin durch seinen sauren pH-Wert (pH 5) eine peritoneale Reizung hervorrufen könnte, die wiederum eine Stressreaktion provozieren könnte [101]. Diese Hypothese konnte von Wells et al. widerlegt werden: Durch die intraperitoneale Gabe von Kochsalzlösung mit einem pH von 5 oder von Cortisol ließen sich die positiven Effekte von Minozyklin auf ein Modell der Rückenmarksverletzung bei Mäusen nicht reproduzieren [102].

### 3. Physiologische Parameter

Nach dem Auslösen einer SAB bei den Versuchstieren besteht die Gefahr, dass die Tiere durch erhöhten Druck auf das Atemzentrum im Hirnstamm aufhören spontan zu atmen. Durch endotracheale Intubation (im Vergleich zu einem Nasenzylinder) kann das Risiko

auf insuffiziente Ventilation verringert und gleichzeitig eine ausreichende Zufuhr von volatilen Anästhetika gewährleistet werden [84]. Den Vorteilen der Intubation muss das Risiko auf Verletzungen der Luftwege und das Entstehen eines Larynxödems gegenübergestellt werden. Im vorliegenden Versuch verstarben vier Tiere noch bevor der Atemweg erfolgreich gesichert werden konnte. Zwei der Versuchstiere erlitten unmittelbar nach der Narkoseeinleitung mit Isofluran einen spontanen Atemstillstand und konnte auch durch unmittelbare Intubation und Ventilation nicht mehr reanimiert werden. Die anderen zwei Ratten verstarben an den Folgen der nicht erfolgreichen Intubation. Um die Risiken der Intubation so gering möglich zu halten wurde stets auf eine sachgerechte Ausführung des Intubationsvorgangs geachtet, ein mehrfacher Intubationsversuch beim selben Versuchstier vermieden und auf das Auftreten von sicheren Intubationszeichen geachtet [84].

Durch eine ausreichende Narkosetiefe kann die adäquate intraoperative Analgesie sichergestellt werden. Dies lässt sich einfach durch das Sistieren bestimmter Reflexe (z.B. Kornealreflex) überprüfen. [84]

Neben dem Hirn- und Blutdruck beeinflusst auch der Kohlenstoffdioxidpartialdruck im Blut die Gehirndurchblutung. Bei einem erhöhten Kohlenstoffdioxidgehalt im Blut erhöht sich durch Autoregulation der intrazerebrale Blutfluss. Experimentelle Studien zeigten, dass diese Autoregulation nach einer SAB zwar leicht verändert, aber dennoch weitestgehend in Takt ist [103, 104]. Weiterhin konnten Hockel und Kollegen nachweisen, dass neben einer inadäquaten Ventilation auch die Narkose mit Isofluran direkt Einfluss auf den Sauerstoff- und Kohlendioxidgehalt im Blut haben [105]. Daher war es während des Eingriffs wichtig regelmäßige Blutgaskontrollen durchzuführen, um inadäquate Ventilation und Effekte der Isofluran Narkose zu detektieren und anzupassen.

In diesem Experiment zeigten sich lediglich bei der ersten Messung (30 min vor SAB) signifikant niedrigere Kohlenstoffdioxidpartialdrücke der Methylprednisolongruppe im Vergleich zu den anderen Versuchsgruppen. Die erste Messung, eine halbe Stunde vor dem Auslösen der SAB, diente hierbei vor allem dazu die Narkose- und Beatmungsparameter adäquat einzustellen. Voraussetzung für die nachfolgende

Gefäßperforation mit dem monofilen Faden war, dass die Blutgase (pH, pCO<sub>2</sub>, pO<sub>2</sub>) im Normalbereich lagen. Falls dies nicht der Fall war, wurde die Beatmung weiter reguliert und kontrolliert. Bei den darauffolgenden Messungen ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen mehr. Daher kann angenommen werden, dass die Ventilationsparameter und Narkosetiefe zwischen allen Versuchsgruppen vergleichbar waren.

Während der Operation wurde versucht die Körpertemperatur der Versuchstiere mittels Rotlichtlampen konstant auf 37° Celsius zu halten, da experimentelle und klinische Studien zeigten, dass Hypothermie nach verschiedenen Formen der Hirnschädigung neuroprotektiv wirkt [106-108]. Außerdem besteht bei einem Eingriff von mehreren Stunden und größeren Wundflächen am Hals und über der Schädelkalotte eine erhöhte Gefahr der Auskühlung. Viele Autoren beschreiben in ihrem Versuchsaufbau die Verwendung eines rektalen Thermometers [3, 84, 85]. In unserem Versuch wurde eine Temperatursonde unter dem Musculus temporalis (und damit an der Schädelbasis) platziert. Damit wurde eine Temperatur gemessen werden, die annäherungsweise der Hirntemperatur entspricht. Dies diente als Basis für die Feedback-kontrollierte intermittierende Wärmung der Tiere.

Wie bereits in Kapitel 6 der Diskussion beschrieben diente das Messen der Hirndurchblutung und des Hirndrucks zum einen der Überprüfung des Einflusses der getesteten Arzneimittel, zum anderen aber auch als Kontrolle der Auslösung einer SAB. Ein plötzlich ansteigender Hirndruck galt hierbei als Zeichen einer erfolgreich ausgelösten SAB.

Im Anschluss an eine SAB kommt es durch das Hämatom im Subarachnoidalraum und gestörte Autoregulation der Gehirndurchblutung zu einem erhöhten intrakraniellen Blutvolumen und folglich zu einem erhöhten intrakraniellen Druck [109]. Daneben können auch die Schädigung der Bluthirnschranke und das rasche Entstehen eines Hirnödems zum Anstieg des ICP beitragen [110, 111]. Letztendlich führt der erhöhte Hirndruck zu einer globalen Minderperfusion des Gehirns, was wiederum in einem hypoxischen Hirnschaden resultiert [54, 92, 112].

Zu erwarten war, dass sowohl Methylprednisolon als auch Minozyklin durch ihre raschen Membran-stabilisierenden und Entzündungs-hemmenden Wirkungen der Entstehung des Hirnödems und der Schädigung der Bluthirnschranke entgegen wirken und so zu einer schnelleren Senkung des ICP beitragen könnten [56, 59, 62, 74, 76, 79].

In unserem Versuch konnte, im Vergleich zu anderen Studien, unmittelbar nach SAB ein etwas geringerer ICP-Anstieg beobachtet werden [113]. Die Ursache hierfür könnte in dem ebenfalls vergleichsweise niedrigen MABP (68-74 mmHg) der Versuchstiere zu finden sein. Die erwartete schnellere Stabilisierung des ICP durch die Gabe der Arzneimittel konnte nicht eindeutig nachgewiesen werden. Der schnellere Abfall des ICPs der Methylprednisolongruppe nach der SAB verfehlte bis auf den 30 Minuten-Wert das Signifikanzniveau. Der langsamere ICP- Abfall der Minozyklintiere könnte, statt auf der Wirkung des Arzneimittels, zu einem Großteil auf zwei Tieren mit einem besonders ausgeprägten ICP- Anstieg beruhen. Bei der vorliegenden Fallzahl haben diese Ausreißer einen entsprechenden Einfluss auf den Mittelwert. Deshalb muss auch hier festgehalten werden, dass die Unterschiede zu keiner Zeit signifikant waren.

In manchen Fällen wird nach einer SAB als Reaktion auf den plötzlichen Hirndruckanstieg ein Anstieg des Blutdruckes beobachtet. Auf diese Weise wird der zerebrale Perfusionsdruck reaktiv gesteigert. Das Phänomen wird Cushing-Reflex genannt [114, 115]. In der Literatur wird allerdings gelegentlich auch der Gegenteilige Effekt, der „inverse Cushing-Reflex“, beschrieben [116].

Im vorliegenden Versuch konnte bei den Tieren der Kontrollgruppe ein milder Blutdruckanstieg gemessen werden. In der Minozyklin- und Methylprednisolongruppe nivellierten sich moderate hyper- und hypotensive Reaktionen weitgehend aus. Es ist unwahrscheinlich, dass die Unterschiede an MABP und CPP auf der Wirkung der Arzneimittel beruht, da der Blutdruckanstieg unmittelbar nach dem Auslösen der SAB (also vor dem Verabreichen der Wirkstoffe) zu erwarten wäre. Die Ursache für diese Beobachtungen bleibt unklar, da ansonsten keine signifikant abweichenden Variablen

zwischen den Versuchsgruppen gefunden werden konnten (siehe z.B. F.2. Ausmaß der SAB).

Soweit bekannt, ist dies die erste Studie, die den Einfluss von Minozyklin auf den Hirndruck und mittleren arteriellen Blutdruck untersucht. Auch für Methylprednisolon sind bisher keine Studien veröffentlicht, die den Effekt des Steroids auf den Hirndruck mit einer Kontrollgruppe vergleichen. Was den Blutdruck angeht stimmen die Ergebnisse mit früheren Publikationen überein: In den klinischen Studien von Hashi et al. und Gomis et al. zeigten sich keine signifikanten Blutdruckunterschiede zwischen Patienten, die mit Hydrocortison bzw. Methylprednisolon behandelt wurden, und Kontrollpatienten [64, 117].

Ein Nachteil der Laser-Doppler-Flowmetrie ist, dass nur ein begrenztes Hirnvolumen gleichzeitig erfasst wird. Aus diesem Grund wurde eine bilaterale Messung der regionalen Hirndurchblutung mittels LDF-Sonden durchgeführt. Während eine unilaterale Veränderung des CBF auf eine lokale Ursache zurückzuführen sein könnte, deutet eine bilaterale Veränderung auf eine globale Gefäßreaktion hin. Ein eindeutiger Vorteil der LDF im Vergleich zu anderen Verfahren des CBF-Monitorings ist die nicht nur intermittierende, sondern kontinuierliche Messung. Eine feste Fixierung des Kopfes des Versuchstieres und eine feste Positionierung im dafür angelegten Bohrloch müssen dafür jedoch gewährleistet sein. In vorliegendem Versuch wurden die Tiere in einen stereotaktischen Rahmen eingespannt und die LDF-Sonden mit Hilfe von Mikromanipulatoren in die Bohrlöcher eingebracht und in Position gehalten.

Da die Laser-Doppler Sonden auch bei regelmäßiger Kalibrierung und sorgfältiger Positionierung, unterschiedliche Startwerte bei den einzelnen Versuchstieren zeigten, wurde die statistische Auswertung der Messwerte in Relativwerten der Ausgangswerte (Baseline) durchgeführt.

Nach bestem Wissen ist dies die erste Studie, die den Einfluss von Minozyklin auf die Gehirndurchblutung mittels Messung des LZBF untersucht. In unserem Versuch konnte lediglich 60 Minuten nach dem Auslösen der SAB ein signifikanter Unterschied im

ipsilateralen LZBF zwischen der Kontroll- und Minozyklingruppe nachgewiesen werden. Dass dieser Effekt auf den Eigenschaften des Arzneimittels beruht – der LZBF der Minozyklintiere stieg nach der Gabe von Minozyklin deutlich an – bleibt unwahrscheinlich. Insgesamt muss die Hypothese, dass Methylprednisolon und Minozyklin die Gehirndurchblutung stabilisieren oder sogar verbessern, in Frage gestellt werden.

In früheren experimentellen Studien gelang es Fox et al. und Chen et al. zu zeigen, dass Methylprednisolon für eine Dilatation der A. basilaris im Anschluss an eine SAB sorgt und somit das Auftreten von Vasospasmen hemmt [58, 60]. Allerdings wurde bei diesen Studien nicht direkt der Blutfluss über beiden Hemisphären gemessen. Außerdem wurde als Model das Doppel-Injektionsmodell verwendet, welches die physiologischen Veränderungen nach einer SAB beim Menschen weniger gut nachahmt (siehe Kapitel G.1) [83].

Im vorliegenden Experiment wurde die Gehirndurchblutung mittels Doppler-Flowmetrie für einen Zeitraum von 3 Stunden nach SAB gemessen. Dass in diesem Intervall keine signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen mit SAB auftraten, lässt keine Schlussfolgerung zu ob sich nicht im Verlauf von weiteren Stunden oder Tagen nach der SAB signifikante Unterschiede finden lassen.

#### 4. Mortalität und Neurologische Nachuntersuchung

Die Gruppenübergreifende Mortalität 24 Stunden nach Auslösung der SAB von 42% stimmt gut mit Mortalitätsraten überein, die andere Autoren bei dem gleichen Modell berichten (44% - 56,7%) [118-120]. Einigen Arbeitsgruppen gelang es mit kleineren Modifikationen des Versuchsprotokolls die Mortalität zu senken ([84, 119]. So zeigte eine frühere Versuchsreihe unserer Arbeitsgruppe, dass sich die Mortalität durch eine längere Nachbeatmungsphase von 6 Stunden drastisch verringern lässt [121]. Dieses Phänomen könnte auf der Tatsache beruhen, dass sich der ICP und der LZBF zu diesem Zeitpunkt dem Ausgangswert weiter angenähert haben und der Atemantrieb und die Schutzreflexe stärker vorhanden sind.



Die Unterschiede in der Mortalität zwischen den Versuchsgruppen mit SAB waren nicht signifikant. Zur selben Schlussfolgerung nach Anwendung von Minozyklin im Fadenmodell waren bereits Sherchan et al. und Li et al. gekommen [72, 97]. Auch für Methylprednisolon existiert bisher keine Studie die konkludiert, dass Methylprednisolon die Mortalität nach einer SAB verringert [63, 64, 122].

Die neurologische Symptomatik der Versuchstiere wurde mit Hilfe von einem Punktwerten evaluiert: Die Spontanaktivität anhand eines modifizierten Beobachtungsprotokolls nach Garcia et al [81] bewertet. Das Protokoll ist ursprünglich bei experimentellen Modellen des ischämischen Schlaganfalls entwickelt worden, wobei wiederholt nachgewiesen werden konnte, dass das Testresultat direkt mit dem Ausmaß der Hirnschädigung korreliert [81, 123-125]. Daher gelten das Testverfahren auch für Modelle der SAB als etabliert [82, 85].

Unter Einbeziehung der bekannten Informationen ist dies die erste experimentelle Studie, die den Effekt von Methylprednisolon auf die klinischen Symptome der Versuchstiere untersucht. Weder 4 noch 24 Stunden nach SAB ließen sich signifikante Unterschiede zwischen den Methylprednisolon- und Kontrolltieren feststellen. Es lässt sich sicher diskutieren ob die Untersuchungszeitpunkte nicht zu früh gewählt wurden. Es ist nicht auszuschließen, dass insbesondere angesichts des geringeren strukturellen Schadens, der in dieser Versuchsreihe beobachtet wurde, nach einem längeren Beobachtungszeitraum doch noch signifikante Unterschiede zu sehen gewesen wären. So zeigten Gomis et al., dass mit Methylprednisolon behandelte Patienten ein Jahr nach SAB ein besseres klinisches Outcome vorwiesen [64].

Auch durch die Behandlung mit Minozyklin konnte in diesem Versuch keine signifikante Verbesserung der neurologischen Untersuchungsergebnisse beobachtet werden. Diese Ergebnisse stimmen überein mit früher publizierten Daten von Sherchan et al. [72]. Auch Sherchan und Kollegen konnten bei derselben Dosierung Minozyklin (45mg/kg) 24 Stunden nach SAB keine signifikante Verbesserung im Garcia-Test feststellen. Das Medikament wurde dabei eine Stunde nach der SAB appliziert. Durch die noch frühere

Verabreichung des Medikaments (30 min nach SAB) hatten wir einen signifikanten Unterschied erwartet. Dies ließ sich allerdings nicht bestätigen.

## 5. Ausmaß der SAB und histologischer Schaden

Das Ausmaß der Subarachnoidalblutung korreliert stark mit dem klinischen Outcome der Versuchstiere [82]. Als eine der größten Herausforderung des endovaskulären Perforationsmodells gilt die schwierige Reproduzierbarkeit des SAB-Schweregrads (siehe Kapitel G.1). Daher galt es nachzuweisen, dass eventuelle Unterschiede in den Messwerten der Versuchsgruppen nicht auf unterschiedliche Ausmaße der SAB zurück zu führen sind. Hierzu wurden die Klassifikation nach Sugawara et al. [82] angewendet.

Im vorliegenden Versuch konnte bei allen Versuchstieren eine SAB nachgewiesen werden. Es wurden außerdem keine Subduralhämatome oder Mediaokklusionen beobachtet. Da keine signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen zu sehen waren, lässt sich schlussfolgern, dass die gemessenen Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen nicht auf Unterschiede im Ausmaß der SAB zurückzuführen sind.

Die „Early Brain Injury“ (EBI, frühe Hirnschädigung) im Anschluss an eine SAB scheint einen wesentlichen Teil zum schlechten Outcome dieser Patientenpopulation beizutragen [45, 126]. In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass entzündliche Vorgänge, oxidativer Schaden durch freie Radikale und die Störung der Blut-Hirnschranke zu unkontrollierter Apoptose und Nekrose und damit zu massiver Hirnschädigung führen [54, 55, 127].

Die Therapie mit Methylprednisolon reduzierte den Anteil Caspase-3 positiver Zellen im Hippocampus 24 Stunden nach SAB signifikant. Caspase 3 ist ein Schlüsselenzym des apoptotischen Zelltodes. Es lässt sich daher schlussfolgern, dass Methylprednisolon die akute Hirnschädigung nach einer SAB vermindert. Nach bestem Wissen ist dies die erste Studie, die den direkten Einfluss von Methylprednisolon auf apoptotische Vorgänge nach einer SAB untersucht.

Methylprednisolon hemmt durch seine Wirkung am Glukokortikoidrezeptor, eine Vielzahl an Enzymen, die an entzündlichen Vorgängen beteiligt sind. So wird zum Beispiel die Aktivität des Transkriptionsfaktors NF-kappa B herabreguliert [56]. Außerdem könnte die anti-apoptotische Wirkung von Methylprednisolon auf der Fähigkeit beruhen die radikalevermittelte Lipidperoxidation und damit den oxidativen Zellschaden zu inhibieren [62, 63]

Auch Minozyklin reduzierte das Vorhandensein von Caspase-3-positiven Zellen in der CA1 Region des Hippocampus der Versuchstiere signifikant. Der neuroprotektive Effekt des Tetrazyklinderivats konnte bereits für eine Vielzahl neurologischer Erkrankungen nachgewiesen werden [99, 128, 129]. Das Ergebnis dieser Studie steht im Einklang mit früheren Studien, die die Wirkung von Minozyklin nach experimenteller SAB untersuchen:

Guo et al. konnten mit Hilfe des Doppelinjektionsmodells der SAB bei Ratten zeigen, dass Minozyklin die EBI durch Inhibierung der Matrix-Metallo-Protease 9 vermindert [71]. Sherchan und Kollegen wendeten das endovaskuläre Perforationsmodell an um zu beweisen, dass Minozyklin in einer Dosierung von 135mg/kg das Hirnödem und den Untergang von Neuronen (Zellzählung nach Nissl-Färbung) vermindert [72].

Kürzlich veröffentlichten Li et al. eine Studie, in der ebenfalls mit Hilfe des endovaskulären Perforationsmodells der Effekt von Minozyklin auf die EBI untersucht wurde: Dabei beschreiben die Autoren eine Reduzierung des Hirnödems und des Schadens der Blut-Hirnschranke (nachgewiesen mittels „Evans Blue Dye“ Paravasat). Außerdem reduzierte Minozyklin nicht nur apoptotische Markerstoffe, sowie p53, Caspase 3 und Bax und apoptotische Zellen im TUNEL-assay, sondern auch Marker für inflammatorische Signalwege, sowie IL-1 $\beta$  und die NLRP3-Inflammasom Aktivität [97]

## **G. Zusammenfassung**

Die Subarachnoidalblutung (SAB) bleibt auf Grund ihrer hohen Mortalität und Morbidität eine gefürchtete Erkrankung. Entzündliche Vorgänge scheinen eine große Rolle in der Entstehung der akuten Hirnschädigung in der Frühphase nach einer SAB zu spielen.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es den Effekt der anti-inflammatorischen Medikamente Methylprednisolon und Minozyklin auf die frühe Gehirnschädigung nach Subarachnoidalblutungen zu untersuchen.

Hierzu wurde ein randomisiertes und kontrolliertes Tierexperiment durchgeführt. Mit Hilfe des endovaskulären Perforationsmodells wurde bei männlichen Sprague-Dawley-Ratten eine SAB ausgelöst. Den Tieren wurde 30 Minuten nach Auftreten der SAB Methylprednisolon, Minozyklin oder Kochsalzlösung intraperitoneal verabreicht. In der sich anschließenden dreistündigen Messphase wurden der Hirndruck, der zerebrale Blutfluss und der mittlere arterielle Blutdruck der Versuchstiere gemessen. Vier Stunden und 24 Stunden nach Auslösung der SAB wurden die Ratten einer neurologischen Untersuchung unterzogen. Nach 24 Stunden wurden die Tiere euthanasiert und die Gehirne für die histologische Aufarbeitung entnommen.

Sowohl Methylprednisolon als auch Minozyklin verminderten den Anteil Caspase 3 positiver Zellen in immunhistochemischen Färbungen der Hippocampie der Versuchstiere signifikant. In Bezug auf die klinische Untersuchung und die Hirndurchblutung der Ratten ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen. Die Ergebnisse suggerieren, dass Methylprednisolon und Minozyklin den akuten Zellschaden nach SAB reduzieren. Daher könnten sich beide Mittel als geeignet für die Therapie der „Early Brain Injury“ nach SAB erweisen.

Weitere Studien zum besseren Verständnis der zugrunde liegenden Wirkmechanismen von Methylprednisolon und Minozyklin auf die Frühphase der SAB sind nötig. Die langjährige klinische Erfahrung mit den allgemeinen Wirkungen und Nebenwirkungen der Wirkstoffe könnte das Umsetzen und Planen klinischer Studien erleichtern.

## H. Literaturverzeichnis

1. Clarke, E., *APOPLEXY IN THE HIPPOCRATIC WRITINGS*. Bull Hist Med, 1963. **37**: p. 301-14.
2. Broderick, J.P., et al., *Initial and recurrent bleeding are the major causes of death following subarachnoid hemorrhage*. Stroke, 1994. **25**(7): p. 1342-7.
3. Bederson, J.B., I.M. Germano, and L. Guarino, *Cortical blood flow and cerebral perfusion pressure in a new noncraniotomy model of subarachnoid hemorrhage in the rat*. Stroke, 1995. **26**(6): p. 1086-91; discussion 1091-2.
4. de Rooij, N.K., et al., *Incidence of subarachnoid haemorrhage: a systematic review with emphasis on region, age, gender and time trends*. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 2007. **78**(12): p. 1365-72.
5. Steiner, T., et al., *European Stroke Organization guidelines for the management of intracranial aneurysms and subarachnoid haemorrhage*. Cerebrovasc Dis, 2013. **35**(2): p. 93-112.
6. Hop, J.W., et al., *Case-fatality rates and functional outcome after subarachnoid hemorrhage: a systematic review*. Stroke, 1997. **28**(3): p. 660-4.
7. le Roux, A.A. and M.C. Wallace, *Outcome and cost of aneurysmal subarachnoid hemorrhage*. Neurosurg Clin N Am, 2010. **21**(2): p. 235-46.
8. Johnston, S.C., S. Selvin, and D.R. Gress, *The burden, trends, and demographics of mortality from subarachnoid hemorrhage*. Neurology, 1998. **50**(5): p. 1413-8.
9. Huang, J. and J.M. van Gelder, *The probability of sudden death from rupture of intracranial aneurysms: a meta-analysis*. Neurosurgery, 2002. **51**(5): p. 1101-5; discussion 1105-7.
10. van Gijn, J., R.S. Kerr, and G.J. Rinkel, *Subarachnoid haemorrhage*. Lancet, 2007. **369**(9558): p. 306-18.
11. Rinkel, G.J., et al., *Prevalence and risk of rupture of intracranial aneurysms: a systematic review*. Stroke, 1998. **29**(1): p. 251-6.
12. van der Schaaf, I.C., et al., *Venous drainage in perimesencephalic hemorrhage*. Stroke, 2004. **35**(7): p. 1614-8.
13. Greebe, P. and G.J. Rinkel, *Life expectancy after perimesencephalic subarachnoid hemorrhage*. Stroke, 2007. **38**(4): p. 1222-4.
14. Feigin, V.L., et al., *Risk factors for subarachnoid hemorrhage: an updated systematic review of epidemiological studies*. Stroke, 2005. **36**(12): p. 2773-80.
15. Korja, M., et al., *Risk factors and their combined effects on the incidence rate of subarachnoid hemorrhage--a population-based cohort study*. PLoS One, 2013. **8**(9): p. e73760.
16. Moskopp, D.W., H., *Neurochirurgie*. 2005, Stuttgart: Schattauer GmbH.
17. Fisher, C.M., G.H. Roberson, and R.G. Ojemann, *Cerebral vasospasm with ruptured saccular aneurysm--the clinical manifestations*. Neurosurgery, 1977. **1**(3): p. 245-8.
18. Heros, R.C., N.T. Zervas, and V. Varsos, *Cerebral vasospasm after subarachnoid hemorrhage: an update*. Ann Neurol, 1983. **14**(6): p. 599-608.
19. Linn, F.H., et al., *Prospective study of sentinel headache in aneurysmal subarachnoid haemorrhage*. Lancet, 1994. **344**(8922): p. 590-3.
20. Greenberg, M., *Handbook of Neurosurgery*. 2016, New York: Thieme.

21. Hunt, W.E. and R.M. Hess, *Surgical risk as related to time of intervention in the repair of intracranial aneurysms*. J Neurosurg, 1968. **28**(1): p. 14-20.
22. van der Wee, N., et al., *Detection of subarachnoid haemorrhage on early CT: is lumbar puncture still needed after a negative scan?* J Neurol Neurosurg Psychiatry, 1995. **58**(3): p. 357-9.
23. Vermeulen, M. and J. van Gijn, *The diagnosis of subarachnoid haemorrhage*. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 1990. **53**(5): p. 365-72.
24. Fisher, C.M., J.P. Kistler, and J.M. Davis, *Relation of cerebral vasospasm to subarachnoid hemorrhage visualized by computerized tomographic scanning*. Neurosurgery, 1980. **6**(1): p. 1-9.
25. Sarker, S.J., et al., *Predictors of survival after haemorrhagic stroke in a multi-ethnic population: the South London Stroke Register (SLSR)*. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 2008. **79**(3): p. 260-5.
26. Aaslid, R., T.M. Markwalder, and H. Nornes, *Noninvasive transcranial Doppler ultrasound recording of flow velocity in basal cerebral arteries*. J Neurosurg, 1982. **57**(6): p. 769-74.
27. Harders, A.G. and J.M. Gillsbach, *Time course of blood velocity changes related to vasospasm in the circle of Willis measured by transcranial Doppler ultrasound*. J Neurosurg, 1987. **66**(5): p. 718-28.
28. Laumer, R., et al., *Cerebral hemodynamics in subarachnoid hemorrhage evaluated by transcranial Doppler sonography. Part 1. Reliability of flow velocities in clinical management*. Neurosurgery, 1993. **33**(1): p. 1-8; discussion 8-9.
29. Dorhout Mees, S.M., et al., *Calcium antagonists for aneurysmal subarachnoid haemorrhage*. Cochrane Database Syst Rev, 2007(3): p. Cd000277.
30. Westermaier, T., et al., *Prophylactic intravenous magnesium sulfate for treatment of aneurysmal subarachnoid hemorrhage: a randomized, placebo-controlled, clinical study*. Crit Care Med, 2010. **38**(5): p. 1284-90.
31. Dorhout Mees, S.M., et al., *Magnesium for aneurysmal subarachnoid haemorrhage (MASH-2): a randomised placebo-controlled trial*. Lancet, 2012. **380**(9836): p. 44-9.
32. Zhang, S., et al., *Tirilazad for aneurysmal subarachnoid haemorrhage*. Cochrane Database Syst Rev, 2010(2): p. Cd006778.
33. Kramer, A.H. and J.J. Fletcher, *Statins in the management of patients with aneurysmal subarachnoid hemorrhage: a systematic review and meta-analysis*. Neurocrit Care, 2010. **12**(2): p. 285-96.
34. Wong, G.K., et al., *Intravenous magnesium sulfate after aneurysmal subarachnoid hemorrhage: current status*. Acta Neurochir Suppl, 2011. **110**(Pt 2): p. 169-73.
35. Vergouwen, M.D., et al., *Effect of statin treatment on vasospasm, delayed cerebral ischemia, and functional outcome in patients with aneurysmal subarachnoid hemorrhage: a systematic review and meta-analysis update*. Stroke, 2010. **41**(1): p. e47-52.
36. Kosnik, E.J. and W.E. Hunt, *Postoperative hypertension in the management of patients with intracranial arterial aneurysms*. J Neurosurg, 1976. **45**(2): p. 148-54.

37. Dankbaar, J.W., et al., *Effect of different components of triple-H therapy on cerebral perfusion in patients with aneurysmal subarachnoid haemorrhage: a systematic review*. Crit Care, 2010. **14**(1): p. R23.
38. Westermaier, T., et al., *Controlled Hypercapnia Enhances Cerebral Blood Flow and Brain Tissue Oxygenation After Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage: Results of a Phase I Study*. Neurocrit Care, 2016. **25**(2): p. 205-14.
39. Kassell, N.F., et al., *Cerebral vasospasm following aneurysmal subarachnoid hemorrhage*. Stroke, 1985. **16**(4): p. 562-72.
40. Pluta, R.M., et al., *Cerebral vasospasm following subarachnoid hemorrhage: time for a new world of thought*. Neurol Res, 2009. **31**(2): p. 151-8.
41. Macdonald, R.L., et al., *Clazosentan, an endothelin receptor antagonist, in patients with aneurysmal subarachnoid haemorrhage undergoing surgical clipping: a randomised, double-blind, placebo-controlled phase 3 trial (CONSCIOUS-2)*. Lancet Neurol, 2011. **10**(7): p. 618-25.
42. Alaraj, A., F.T. Charbel, and S. Amin-Hanjani, *Peri-operative measures for treatment and prevention of cerebral vasospasm following subarachnoid hemorrhage*. Neurol Res, 2009. **31**(6): p. 651-9.
43. Sehba, F.A., R.M. Pluta, and J.H. Zhang, *Metamorphosis of subarachnoid hemorrhage research: from delayed vasospasm to early brain injury*. Mol Neurobiol, 2011. **43**(1): p. 27-40.
44. Cahill, J., J.W. Calvert, and J.H. Zhang, *Mechanisms of early brain injury after subarachnoid hemorrhage*. J Cereb Blood Flow Metab, 2006. **26**(11): p. 1341-53.
45. Sehba, F.A., et al., *The importance of early brain injury after subarachnoid hemorrhage*. Prog Neurobiol, 2012. **97**(1): p. 14-37.
46. Topkoru, B., et al., *Early Brain Injury or Vasospasm? An overview of Common Mechanisms*. Curr Drug Targets, 2016.
47. Fujii, M., et al., *Early brain injury, an evolving frontier in subarachnoid hemorrhage research*. Transl Stroke Res, 2013. **4**(4): p. 432-46.
48. Handa, Y., et al., *Expression of intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) on the cerebral artery following subarachnoid haemorrhage in rats*. Acta Neurochir (Wien), 1995. **132**(1-3): p. 92-7.
49. Lin, C.L., et al., *Monoclonal antibody against E selectin attenuates subarachnoid hemorrhage-induced cerebral vasospasm*. Surg Neurol, 2005. **64**(3): p. 201-5; discussion 205-6.
50. Mathiesen, T., et al., *Cerebrospinal fluid interleukin-1 receptor antagonist and tumor necrosis factor-alpha following subarachnoid hemorrhage*. J Neurosurg, 1997. **87**(2): p. 215-20.
51. Gruber, A., et al., *Ventricular cerebrospinal fluid and serum concentrations of sTNFR-I, IL-1ra, and IL-6 after aneurysmal subarachnoid hemorrhage*. J Neurosurg Anesthesiol, 2000. **12**(4): p. 297-306.
52. Sercombe, R., Y.R. Dinh, and P. Gomis, *Cerebrovascular inflammation following subarachnoid hemorrhage*. Jpn J Pharmacol, 2002. **88**(3): p. 227-49.
53. Ma, Q., et al., *NLRP3 inflammasome contributes to inflammation after intracerebral hemorrhage*. Ann Neurol, 2014. **75**(2): p. 209-19.
54. Ostrowski, R.P., A.R. Colohan, and J.H. Zhang, *Molecular mechanisms of early brain injury after subarachnoid hemorrhage*. Neurol Res, 2006. **28**(4): p. 399-414.

55. Hasegawa, Y., et al., *Apoptotic mechanisms for neuronal cells in early brain injury after subarachnoid hemorrhage*. Acta Neurochir Suppl, 2011. **110**(Pt 1): p. 43-8.
56. Almawi, W.Y. and O.K. Melemedjian, *Negative regulation of nuclear factor-kappaB activation and function by glucocorticoids*. J Mol Endocrinol, 2002. **28**(2): p. 69-78.
57. Banik, N.L., et al., *A new mechanism of methylprednisolone and other corticosteroids action demonstrated in vitro: inhibition of a proteinase (calpain) prevents myelin and cytoskeletal protein degradation*. Brain Res, 1997. **748**(1-2): p. 205-10.
58. Chen, D., et al., *High-dose methylprednisolone prevents vasospasm after subarachnoid hemorrhage through inhibition of protein kinase C activation*. Neurol Res, 2002. **24**(2): p. 215-22.
59. Yamakawa, K., et al., *Effect of high-dose methylprednisolone on vasospasm after subarachnoid hemorrhage*. Neurol Med Chir (Tokyo), 1991. **31**(1): p. 24-31.
60. Fox, J.L. and M.G. Yasargil, *The relief of intracranial vasospasm: an experimental study with methylprednisolone and cortisol*. Surg Neurol, 1975. **3**(4): p. 214-8.
61. Chyatte, D., N. Rusch, and T.M. Sundt, Jr., *Prevention of chronic experimental cerebral vasospasm with ibuprofen and high-dose methylprednisolone*. J Neurosurg, 1983. **59**(6): p. 925-32.
62. Bracken, M.B., et al., *A randomized, controlled trial of methylprednisolone or naloxone in the treatment of acute spinal-cord injury. Results of the Second National Acute Spinal Cord Injury Study*. N Engl J Med, 1990. **322**(20): p. 1405-11.
63. Lombardi, D., et al., *Effect of high-dose methylprednisolone on anti-oxidant enzymes after experimental SAH*. J Neurol Sci, 1992. **111**(1): p. 13-9.
64. Gomis, P., et al., *Randomized, double-blind, placebo-controlled, pilot trial of high-dose methylprednisolone in aneurysmal subarachnoid hemorrhage*. J Neurosurg, 2010. **112**(3): p. 681-8.
65. Yong, V.W., et al., *The promise of minocycline in neurology*. Lancet Neurol, 2004. **3**(12): p. 744-51.
66. Saivin, S. and G. Houin, *Clinical pharmacokinetics of doxycycline and minocycline*. Clin Pharmacokinet, 1988. **15**(6): p. 355-66.
67. Garrido-Mesa, N., A. Zarzuelo, and J. Galvez, *Minocycline: far beyond an antibiotic*. Br J Pharmacol, 2013. **169**(2): p. 337-52.
68. Lampl, Y., et al., *Minocycline treatment in acute stroke: an open-label, evaluator-blinded study*. Neurology, 2007. **69**(14): p. 1404-10.
69. Elewa, H.F., et al., *Minocycline for short-term neuroprotection*. Pharmacotherapy, 2006. **26**(4): p. 515-21.
70. Bahrami, F., D.L. Morris, and M.H. Pourgholami, *Tetracyclines: drugs with huge therapeutic potential*. Mini Rev Med Chem, 2012. **12**(1): p. 44-52.
71. Guo, Z.D., et al., *Protection of minocycline on early brain injury after subarachnoid hemorrhage in rats*. Acta Neurochir Suppl, 2011. **110**(Pt 1): p. 71-4.
72. Sherchan, P., et al., *Minocycline improves functional outcomes, memory deficits, and histopathology after endovascular perforation-induced subarachnoid hemorrhage in rats*. J Neurotrauma, 2011. **28**(12): p. 2503-12.



73. Koistinaho, M., et al., *Minocycline protects against permanent cerebral ischemia in wild type but not in matrix metalloprotease-9-deficient mice*. J Cereb Blood Flow Metab, 2005. **25**(4): p. 460-7.
74. Stirling, D.P., et al., *Minocycline as a neuroprotective agent*. Neuroscientist, 2005. **11**(4): p. 308-22.
75. Dalm, D., et al., *Nonantibiotic properties of tetracyclines: structural basis for inhibition of secretory phospholipase A2*. J Mol Biol, 2010. **398**(1): p. 83-96.
76. Heo, K., et al., *Minocycline inhibits caspase-dependent and -independent cell death pathways and is neuroprotective against hippocampal damage after treatment with kainic acid in mice*. Neurosci Lett, 2006. **398**(3): p. 195-200.
77. Dumont, E.A., et al., *Minocycline inhibits apoptotic cell death in a murine model of partial flap loss*. J Reconstr Microsurg, 2010. **26**(8): p. 523-8.
78. Chen, M., et al., *Minocycline inhibits caspase-1 and caspase-3 expression and delays mortality in a transgenic mouse model of Huntington disease*. Nat Med, 2000. **6**(7): p. 797-801.
79. Morimoto, N., et al., *Minocycline inhibits oxidative stress and decreases in vitro and in vivo ischemic neuronal damage*. Brain Res, 2005. **1044**(1): p. 8-15.
80. Paxinos, G.W., c., *The rat brain in stereotaxic coordinates*. 5th Edition ed. 2005.
81. Garcia, J.H., et al., *Neurological deficit and extent of neuronal necrosis attributable to middle cerebral artery occlusion in rats. Statistical validation*. Stroke, 1995. **26**(4): p. 627-34; discussion 635.
82. Sugawara, T., et al., *A new grading system evaluating bleeding scale in filament perforation subarachnoid hemorrhage rat model*. J Neurosci Methods, 2008. **167**(2): p. 327-34.
83. Lee, J.Y., et al., *Comparison of experimental rat models of early brain injury after subarachnoid hemorrhage*. Neurosurgery, 2009. **65**(2): p. 331-43; discussion 343.
84. Sehba, F.A., *Rat endovascular perforation model*. Transl Stroke Res, 2014. **5**(6): p. 660-8.
85. Titova, E., et al., *Experimental models of subarachnoid hemorrhage for studies of cerebral vasospasm*. Neurol Res, 2009. **31**(6): p. 568-81.
86. Lee, J.Y., et al., *Characterization of an improved double hemorrhage rat model for the study of delayed cerebral vasospasm*. J Neurosci Methods, 2008. **168**(2): p. 358-66.
87. Meguro, T., et al., *Improved rat model for cerebral vasospasm studies*. Neurol Res, 2001. **23**(7): p. 761-6.
88. Veelken, J.A., R.J. Laing, and J. Jakubowski, *The Sheffield model of subarachnoid hemorrhage in rats*. Stroke, 1995. **26**(7): p. 1279-83; discussion 1284.
89. Sehba, F.A. and V. Friedrich, *Early events after aneurysmal subarachnoid hemorrhage*. Acta Neurochir Suppl, 2015. **120**: p. 23-8.
90. Chaichana, K.L., et al., *Role of inflammation (leukocyte-endothelial cell interactions) in vasospasm after subarachnoid hemorrhage*. World Neurosurg, 2010. **73**(1): p. 22-41.
91. Sabri, M., E. Lass, and R.L. Macdonald, *Early brain injury: a common mechanism in subarachnoid hemorrhage and global cerebral ischemia*. Stroke Res Treat, 2013. **2013**: p. 394036.
92. Prunell, G.F., et al., *Delayed cell death related to acute cerebral blood flow changes following subarachnoid hemorrhage in the rat brain*. J Neurosurg, 2005. **102**(6): p. 1046-54.

93. Chyatte, D., et al., *Preliminary report: effects of high dose methylprednisolone on delayed cerebral ischemia in patients at high risk for vasospasm after aneurysmal subarachnoid hemorrhage*. Neurosurgery, 1987. **21**(2): p. 157-60.
94. Feigin, V.L., et al., *Corticosteroids for aneurysmal subarachnoid haemorrhage and primary intracerebral haemorrhage*. Cochrane Database Syst Rev, 2005(3): p. Cd004583.
95. Czorlich, P., et al., *Impact of dexamethasone in patients with aneurysmal subarachnoid haemorrhage*. Eur J Neurol, 2017. **24**(4): p. 645-651.
96. Domercq, M. and C. Matute, *Neuroprotection by tetracyclines*. Trends Pharmacol Sci, 2004. **25**(12): p. 609-12.
97. Li, J., et al., *Minocycline Protects Against NLRP3 Inflammasome-Induced Inflammation and P53-Associated Apoptosis in Early Brain Injury After Subarachnoid Hemorrhage*. Mol Neurobiol, 2015.
98. Andes, D. and W.A. Craig, *Animal model pharmacokinetics and pharmacodynamics: a critical review*. Int J Antimicrob Agents, 2002. **19**(4): p. 261-8.
99. Matsukawa, N., et al., *Therapeutic targets and limits of minocycline neuroprotection in experimental ischemic stroke*. BMC Neurosci, 2009. **10**: p. 126.
100. Friedrich, V., R. Flores, and F.A. Sehba, *Cell death starts early after subarachnoid hemorrhage*. Neurosci Lett, 2012. **512**(1): p. 6-11.
101. Nessler, S., et al., *Effect of minocycline in experimental autoimmune encephalomyelitis*. Ann Neurol, 2002. **52**(5): p. 689-90; author reply 690.
102. Wells, J.E., et al., *Neuroprotection by minocycline facilitates significant recovery from spinal cord injury in mice*. Brain, 2003. **126**(Pt 7): p. 1628-37.
103. Schmieder, K., et al., *CO2 reactivity in patients after subarachnoid haemorrhage*. Acta Neurochir (Wien), 1997. **139**(11): p. 1038-41.
104. Diringer, M.N., et al., *Altered cerebrovascular CO2 reactivity following subarachnoid hemorrhage in cats*. J Neurosurg, 1993. **78**(6): p. 915-21.
105. Hockel, K., et al., *Impact of anesthesia on pathophysiology and mortality following subarachnoid hemorrhage in rats*. Exp Transl Stroke Med, 2012. **4**(1): p. 5.
106. Hoesch, R.E. and R.G. Geocadin, *Therapeutic hypothermia for global and focal ischemic brain injury--a cool way to improve neurologic outcomes*. Neurologist, 2007. **13**(6): p. 331-42.
107. Nagel, S., et al., *Therapeutic hypothermia in experimental models of focal and global cerebral ischemia and intracerebral hemorrhage*. Expert Rev Neurother, 2008. **8**(8): p. 1255-68.
108. MacLellan, C.L., et al., *Use of prolonged hypothermia to treat ischemic and hemorrhagic stroke*. J Neurotrauma, 2009. **26**(3): p. 313-23.
109. Grote, E. and W. Hassler, *The critical first minutes after subarachnoid hemorrhage*. Neurosurgery, 1988. **22**(4): p. 654-61.
110. Claassen, J., et al., *Global cerebral edema after subarachnoid hemorrhage: frequency, predictors, and impact on outcome*. Stroke, 2002. **33**(5): p. 1225-32.
111. Sasaki, T., et al., *Barrier disruption in the major cerebral arteries during the acute stage after experimental subarachnoid hemorrhage*. Neurosurgery, 1986. **19**(2): p. 177-84.

112. Jeon, H., et al., *Learning deficits after experimental subarachnoid hemorrhage in rats*. Neuroscience, 2010. **169**(4): p. 1805-14.
113. Westermaier, T., et al., *Acute vasoconstriction: decrease and recovery of cerebral blood flow after various intensities of experimental subarachnoid hemorrhage in rats*. J Neurosurg, 2009. **110**(5): p. 996-1002.
114. Trojanowski, T., *Early effects of experimental arterial subarachnoid haemorrhage on the cerebral circulation. Part I: Experimental subarachnoid haemorrhage in cat and its pathophysiological effects. Methods of regional cerebral blood flow measurement and evaluation of microcirculation*. Acta Neurochir (Wien), 1984. **72**(1-2): p. 79-94.
115. Dickinson, C.J., *Reappraisal of the Cushing reflex: the most powerful neural blood pressure stabilizing system*. Clin Sci (Lond), 1990. **79**(6): p. 543-50.
116. Marshman, L.A., *Cushing's 'variant' response (acute hypotension) after subarachnoid hemorrhage. Association with moderate intracranial tensions and subacute cardiovascular collapse*. Stroke, 1997. **28**(7): p. 1445-50.
117. Hashi, K., et al., *[Intravenous hydrocortisone in large doses in the treatment of delayed ischemic neurological deficits following subarachnoid hemorrhage--results of a multi-center controlled double-blind clinical study]*. No To Shinkei, 1988. **40**(4): p. 373-82.
118. Prunell, G.F., et al., *Experimental subarachnoid hemorrhage: subarachnoid blood volume, mortality rate, neuronal death, cerebral blood flow, and perfusion pressure in three different rat models*. Neurosurgery, 2003. **52**(1): p. 165-75; discussion 175-6.
119. Park, I.S., et al., *Subarachnoid hemorrhage model in the rat: modification of the endovascular filament model*. J Neurosci Methods, 2008. **172**(2): p. 195-200.
120. Gules, I., et al., *Comparison of three rat models of cerebral vasospasm*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2002. **283**(6): p. H2551-9.
121. Westermaier, T., et al., *Time-course of cerebral perfusion and tissue oxygenation in the first 6 h after experimental subarachnoid hemorrhage in rats*. J Cereb Blood Flow Metab, 2009. **29**(4): p. 771-9.
122. Schurkamper, M., et al., *Dexamethasone in the treatment of subarachnoid hemorrhage revisited: a comparative analysis of the effect of the total dose on complications and outcome*. J Clin Neurosci, 2004. **11**(1): p. 20-4.
123. Bederson, J.B., et al., *Rat middle cerebral artery occlusion: evaluation of the model and development of a neurologic examination*. Stroke, 1986. **17**(3): p. 472-6.
124. Menzies, S.A., J.T. Hoff, and A.L. Betz, *Middle cerebral artery occlusion in rats: a neurological and pathological evaluation of a reproducible model*. Neurosurgery, 1992. **31**(1): p. 100-6; discussion 106-7.
125. Zausinger, S., et al., *Neurological impairment in rats after transient middle cerebral artery occlusion: a comparative study under various treatment paradigms*. Brain Res, 2000. **863**(1-2): p. 94-105.
126. Caner, B., et al., *Transition of research focus from vasospasm to early brain injury after subarachnoid hemorrhage*. J Neurochem, 2012. **123 Suppl 2**: p. 12-21.
127. Miller, B.A., et al., *Inflammation, vasospasm, and brain injury after subarachnoid hemorrhage*. Biomed Res Int, 2014. **2014**: p. 384342.

128. Choi, Y., et al., *Minocycline attenuates neuronal cell death and improves cognitive impairment in Alzheimer's disease models*. *Neuropsychopharmacology*, 2007. **32**(11): p. 2393-404.
129. Sanchez Mejia, R.O., et al., *Minocycline reduces traumatic brain injury-mediated caspase-1 activation, tissue damage, and neurological dysfunction*. *Neurosurgery*, 2001. **48**(6): p. 1393-9; discussion 1399-401.

## I. Abbildungsverzeichnis

<i>Abb. 1: Klassifikation der SAB nach Hunt und Hess [21]</i> .....	6
<i>Abb. 2: Klassifikation des Ausmaßes der SAB im CT nach Fisher [25]</i> .....	7
<i>Abb. 3: a. CCT kurz nach einer Subarachnoidalblutung.. b. CT- Angiographie axial: rupturiertes Aneurysma der A. cerebri media links. c. Aneurysma in der 3D-Rekonstruktion der CT-Angiographie</i> .....	7
<i>Abb.4: Vereinfachte Übersicht über Pathomechanismen im Rahmen der „Early Brain Injury“</i> .....	11
<i>Abb. 5: Vereinfachte Übersicht über den erwarteten Wirkmechanismus von Methylprednisolon im Rahmen der SAB</i> .....	12
<i>Abb. 6: Vereinfachte Übersicht über den erwarteten Wirkmechanismus von Minozyklin im Rahmen der SAB</i> .....	14
<i>Abb 7: Knöcherner Rattenschädel mit Position der Bohrlöcher für die Messsonden</i> ....	20
<i>Abb. 8: Technik der endovaskulären Perforation</i> .....	21
<i>Abb. 9: Übersicht über den Versuchsablauf</i> .....	23
<i>Abb. 10: Punktwert der neurologischen Untersuchung</i> .....	24
<i>Abb. 11: Zeitpunkte des Messwertvergleichs</i> .....	24
<i>Abb. 12: Bestimmung des Schweregrads der SAB anhand des Scores nach Sugawara et al [82]:</i> .....	26
<i>Abb. 13: Rattengehirn in Caspase3 und DAPI Färbung, CA1- Region</i> .....	27
<i>Abb. 14: Durchschnittliches Gewicht und Gewichtsverlust präoperativ, 4 Stunden und 24 Stunden nach SAB</i> .....	29
<i>Abb. 15: Gewicht der Versuchstiere vor OP- Beginn und der Gewichtsverlust 4 Stunden und 24 Stunden nach SAB</i> .....	29
<i>Abb. 16: Durchschnittliche pH – Werte der Versuchsgruppen im Versuchsverlauf</i> .....	30
<i>Abb. 17: Durchschnittliche pO<sub>2</sub>- Werte der Versuchsgruppen im Versuchsverlauf</i> .....	30
<i>Abb. 18: Durchschnittliche pCO<sub>2</sub>- Werte der Versuchsgruppen im Versuchsverlauf</i> ....	31
<i>Abb. 19: Mittlerer arterieller Blutdruck (MABP) im Versuchsverlauf</i> .....	32
<i>Abb. 20: Intrakranieller Druck (ICP) im Versuchsverlauf</i> .....	33
<i>Abb. 21: Zerebraler Perfusionsdruck (CPP) im Versuchsverlauf</i> .....	34
<i>Abb. 22: Relativwerte des lokalen zerebralen Blutflusses der ipsilateralen Seite</i> .....	35

<i>Abb. 23: Relativwerte des lokalen zerebralen Blutflusses der ipsilateralen Seite.....</i>	<i>36</i>
<i>Abb. 24: Anzahl und Anteil der innerhalb der ersten 24 Stunden verstorbenen Tiere pro Versuchsgruppe .....</i>	<i>38</i>
<i>Abb. 25: Aktivitätsscore 4 Stunden und 24 Stunden nach SAB .....</i>	<i>38</i>
<i>Abb 26: Graph der neurologischen Untersuchung nach der 5-Punkt-Aktivitätsskala 4 Stunden und 24 Stunden nach SAB.....</i>	<i>39</i>
<i>Abb. 27: Ausmaß der subarachnoidalen Blutung, bestimmt mit Hilfe der semiquantitativen Klassifikation nach Sugawara et al. ....</i>	<i>40</i>
<i>Abb. 28: Anteil der Caspase- 3 positiven Zellen an der Gesamtanzahl der Neurone pro Bildausschnitt.....</i>	<i>41</i>

## **J. Danksagung**

Zunächst möchte ich mich herzlich bei Herrn Prof. Dr. med. Thomas Westermaier für die Vergabe des Promotionsthemas, die Einarbeitung in die im Tiermodell verwendeten Operationstechniken und die hochqualifizierte und konstruktive Unterstützung über den gesamten Ablauf der Promotion hinweg bedanken.

Des Weiteren bedanke ich mich bei Dr. med. Stefan Köhler, der mir als Betreuer für diese Promotion immer freundlich und hilfsbereit zur Seite stand. Vielen Dank für die fachliche Anleitung bei den Experimenten und den zahlreichen Hilfestellungen bei der Auswertung der Daten und der Erstellung dieser Dissertation.

Auch danke ich Frau Helga Brünner, Corinna, Dr. med. Judith Weiland und Diana Köhler für die Anleitung, die Unterstützung und den kollegialen Austausch im Tier-OP und Labor.

Einen besonderen Dank möchte ich meiner Frau Imke und meiner Familie für die uneingeschränkte Unterstützung und das Vertrauen während des Studiums und der Promotion aussprechen.

## K. Lebenslauf

### Persönliche Daten

---

Name: Vadokas, Georg Dimitris  
Geburtsdatum/-ort: 02.11.1989, in Göttingen  
Staatsangehörigkeit: Deutsch

### Berufliche Laufbahn

---

03/2019 – bis heute St.-Antonius-Hospital Kleve:  
Assistenzarzt der Klinik und Poliklinik für Urologie  
03/2017 – 01/2019 Canisius- Wilhelmina- Krankenhaus, Nijmegen (NL):  
Assistenzarzt der Klinik und Poliklinik für Urologie

### Hochschulbildung

---

04/2010 – 12/2016 Julius-Maximilians-Universität Würzburg:  
Studium der Humanmedizin  
Dissertation: Neurochirurgische Klinik und Poliklinik,  
Universitätsklinikum Würzburg bei Prof. Dr. med.  
Thomas Westermaier:  
Experimentelle Subarachnoidalblutung bei Ratten:  
Methylprednisolon und Minozyklin zur Behandlung  
der „Early Brain Injury“  
Datum der Verteidigung:  
Auslandssemester: Aristoteles Universität Thessaloniki (GR):  
ERASMUS- Programm (SS 2013)

### Schulbildung/ Wehrdienst

---

07/2009 – 04/2010 3./Feldjägerbataillon 152 Munster: Grundwehrdienst  
09/2002 – 06/2009 Felix- Klein- Gymnasium Göttingen:



09/2000 – 07/2002

Bert- Brecht- Orientierungsstufe Göttingen

09/1996 – 07/2000

Hermann- Nohl- Grundschule Göttingen

### Sonstiges

---

Sprachkenntnisse:

**Deutsch** (Muttersprache),

**Englisch** (verhandlungssicher, in Wort und Schrift),

**Griechisch** (konversationssicher)

**Niederländisch** (verhandlungssicher, in Wort und Schrift),