

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

**Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Ralf-Ingo Ernestus**

**Untersuchung des Pyruvatdehydrogenasekomplexes in der  
Frühphase nach experimenteller Subarachnoidalblutung**

**Inaugural - Dissertation**

**zur Erlangung der Doktorwürde der**

**Medizinischen Fakultät**

**der**

**Julius-Maximilians-Universität Würzburg**

**vorgelegt von**

**Hannah Christine Füllgraf**

**aus Meppen**

**Würzburg, September 2017**



Referent: Prof. Dr. med. Thomas Westermaier

Koreferentin: Prof. Dr. Alma Zerneck-Madsen

Dekan: Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 16.03.2018

Die Promovendin ist Ärztin

## Inhaltsverzeichnis

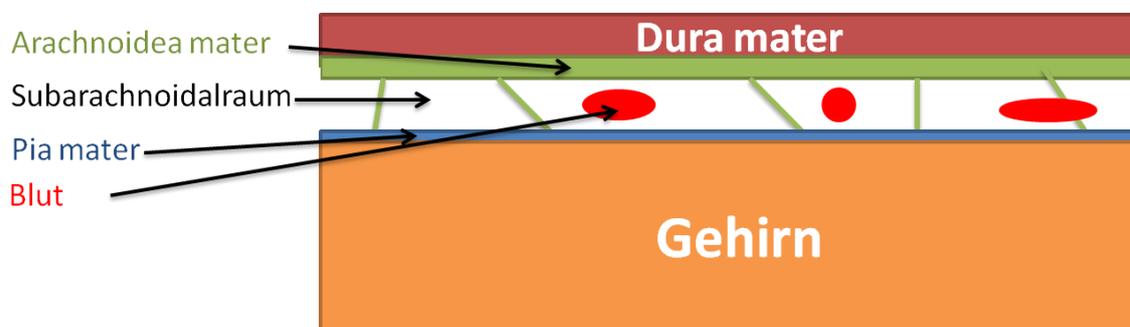
1	Einleitung.....	1
1.1	Subarachnoidalblutung (SAB) .....	1
1.1.1	Symptome.....	2
1.1.2	Diagnostik .....	3
1.1.3	Prognose .....	3
1.1.4	Pathophysiologie .....	6
1.1.5	Therapie.....	10
1.2	Pyruvatdehydrogenasekomplex (PDHC).....	11
1.2.1	Aufbau .....	11
1.2.2	Reaktion.....	12
1.2.3	Enzymaktivität .....	13
1.3	Sauerstoffsättigung.....	14
1.4	Intrazerebrale Hyperglykämie .....	15
1.5	Ischämie .....	15
1.6	Fragestellung.....	16
2	Material und Methoden.....	17
2.1	Operation der Ratten.....	17
2.1.1	Tiere .....	17
2.1.2	Vorbereitung und Überwachung.....	17
2.1.3	Intraarterielle Blutdruckmessung.....	18
2.1.4	Auslösen der SAB.....	19
2.1.5	Präparation des Hippocampus .....	20
2.2	Immunhistochemie .....	21
2.2.1	Histologische Schnitte .....	21
2.2.2	Immunhistochemische Färbung .....	22
2.2.3	Auswertung der Immunhistochemie.....	24
2.2.4	Messung der Aktivität des PDHC im Rattengehirn.....	25
2.3	Statistische Auswertung .....	28
3	Ergebnisse .....	28

3.1	Operation der Ratten.....	28
3.1.1	Physiologische Parameter .....	28
3.1.2	Intraarterielle Blutdruckmessung.....	28
3.1.3	Messung des intrakraniellen Drucks (ICP).....	30
3.1.4	Zerebraler Perfusionsdruck (CPP).....	31
3.1.5	Messung der Hirndurchblutung (CBF).....	32
3.2	Immunhistochemische Färbung .....	35
3.3	Messung der Aktivität des PDHC .....	38
4	Diskussion.....	40
4.1	MABP, ICP, CPP, CBF .....	40
4.2	Immunhistochemische Färbung .....	40
4.3	PDHC-Aktivität .....	41
4.3.1	PDHC.....	42
4.3.2	Ischämie und Niedrig-Flusssituation nach SAB .....	52
4.3.3	Therapeutische Optionen.....	53
4.4	Klinische Bedeutung und translationaler Ansatz.....	55
5	Zusammenfassung.....	56
6	Literatur und Abbildungsverzeichnis.....	57
6.1	Literaturverzeichnis .....	57
6.2	Eigene Veröffentlichungen .....	67
6.3	Abbildungsverzeichnis .....	69

# 1 Einleitung

## 1.1 Subarachnoidalblutung (SAB)

Die SAB ist eine schwerwiegende und vital bedrohliche zerebrovaskuläre Erkrankung, mit einer hohen Morbidität und Mortalität [1]. Nach van Gijn et al. liegt die Sterblichkeitsrate der SAB bei ca. 50 % [2]. Bei der SAB kommt es zu Blutaustritt in den Liquorraum [3]. Die Pia mater, als Überzug des Hirngewebes, stellt die Innerste der drei Hirnhäute dar und bildet die innere Liquorgrenze. Das ausgetretene Blut befindet sich, wie der Liquor, subarachnoidal, also zwischen Pia mater und Arachnoidea mater.



**Abbildung 1:** Schematisch - Hirnhäute mit subarachnoidalem Blut (selbst erstellt)

Eine SAB kann durch ein Trauma bedingt sein oder spontan auftreten. In 85 % der Fälle einer spontanen SAB kommt es durch eine Ruptur eines Aneurysmas der Hirnbasisarterien zum Austritt arteriellen Blutes in den Subarachnoidalraum. Weitere Ursachen nicht-traumatischer SAB sind die nicht-aneurysmatische perimesenzepale SAB, die 10 % der Fälle ausmacht [2], Blutungen aus arteriovenösen Malformationen und auch durch venöse Thrombosen [4]. Die Inzidenz der aneurysmatischen SAB liegt in Mitteleuropa bei etwa 7-10 Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohner [1], mit einer höheren Inzidenz in Finnland mit 19,7 pro 100.000. Die höchste Inzidenz findet sich in Japan mit 22,7 pro 100.000 Einwohnern [5]. Die wichtigsten Risikofaktoren für eine

aneurysmatische SAB sind Nikotinabusus, arterielle Hypertonie und exzessiver Alkoholkonsum [6]. Als prädisponierende Faktoren sind auch genetische Erkrankungen zu nennen, wobei diese nur einen geringen Anteil der SAB-Patienten ausmachen. Prädominant ist hier zum Beispiel die autosomale polyzystische Nierenerkrankung (ADPKD) zu nennen, diese bedingt gehäuft auftretende kraniale Aneurysmata, die früher rupturieren, macht aber insgesamt nur knapp 2 % der SAB-Patienten aus und ist damit die häufigste der genetisch bedingten SAB-Ursachen [7]. Weiterhin werden das Ehlers-Danlos Syndrom und auch das Marfan Syndrom aufgeführt [8, 9]. Auch wird eine familiäre Disposition gegenüber Aneurysmata in der Literatur angegeben und ein häufigeres Auftreten beim weiblichen Geschlecht, besonders im Alter über 55 Jahre [5]. Aneurysmata treten bevorzugt, zu etwa 86,5 %, innerhalb der vorderen Zirkulation auf, hier am häufigsten im Bereich der A. communicans anterior mit 30 %, gefolgt von Aneurysmata der A. communicans posterior (hintere Zirkulation, 25 %) [10].

### 1.1.1 Symptome

In den meisten Fällen wird die SAB durch stärkste Kopfschmerzen klinisch auffällig. Parallel dazu finden sich häufig Übelkeit und Erbrechen [11], weiterhin tritt häufig eine Meningismussymptomatik auf, die auf eine blutungsbedingte Reizung der Meningen zurückzuführen ist [1]. Eine Bewusstseinsstörung oder Bewusstlosigkeit tritt in über der Hälfte der Fälle auf [11], eine sekundäre Bewusstseinsintrübung kann Hinweis auf eine Nachblutung [12] oder einen Liquoraufstau [13] sein. Etwa 20 % der Patienten entwickeln einen Krampfanfall. Weitere Symptome, die im Zusammenhang mit der SAB beobachtet wurden, sind zum Beispiel Herzrhythmusstörungen, Hyperglykämie oder hypertensive Entgleisungen [11]. Ibrahim et al. fanden im EKG vor allem QT-Zeit Verlängerungen, aber auch Bradykardien und unspezifische ST-Strecken-Veränderungen, vereinzelt auch ST-Strecken-Hebungen oder -Senkungen [14, 15]. Erklärungen einer Hyperglykämie nach der SAB sind eine Beta-Zell-Dysfunktion oder eine Insulinresistenz, die die Zellen nach einer SAB entwickeln [16]. Zur hypertensiven Entgleisung zeigten Hockel et al. im Tierversuch in der Ratte einen frühen und einen

späten Blutdruckanstieg nach einer SAB [17]. Nach einer SAB können Komplikationen auftreten, die den weiteren Verlauf stark beeinflussen. Hier sind Hypernatriämien, kardiopulmonale Komplikationen, Hyperglykämien, Fieber (41-72 %) oder auch Pneumonien zu nennen [18, 19]. Weiter ist zu erwähnen, dass es durch eine Liquorabflussbehinderung zum Verschlusshydrozephalus mit akuter Erhöhung des Hirndrucks kommen kann [1].

### 1.1.2 Diagnostik

Zur Diagnostik einer SAB dient primär die native kranielle Computertomographie (cCT). Mit dieser Form der Bildgebung kann eine subarachnoidale Blutung mit einer Sensitivität von ca. 98 % innerhalb der ersten 12 Stunden diagnostiziert werden. Die digitale Subtraktionsangiographie ist die Standarduntersuchung zur Detektion zerebrovaskulärer Fehlbildungen und somit der Feststellung der Blutungsquelle [20]. Sie bietet den Vorteil der besseren Auflösung und die Möglichkeit einer direkten Aneurysmaausschaltung mittels Coiling bei geeigneter Größe, Lokalisation und Formation des Aneurysmas [21]. Als weitere diagnostische Option ist in seltenen Fällen noch eine Lumbalpunktion nötig [22].

### 1.1.3 Prognose

Trotz immer weiter optimierter Diagnostik, verschiedener nicht-operativer und operativer Therapieoptionen, sowohl im Akutstadium als auch im Verlauf der SAB, und intensiver wissenschaftlicher Forschung in den Bereichen der Pathophysiologie und Therapie der SAB, ist es bislang nicht gelungen, die Morbidität und die Mortalität zufriedenstellend zu senken [1]. Die 12-Monats-Überlebensrate liegt derzeit bei ca. 50 %, wobei von den Überlebenden die Hälfte auf kontinuierliche Hilfe im Alltag angewiesen bleibt und eine deutliche Einschränkung der Lebensqualität aufweist [23]. Ein wichtiger prognostischer Faktor der SAB ist die Einteilung nach dem Hunt/Hess Score [24]. Es gibt Studien, in denen dieser Score besser mit dem Outcome der SAB-Patienten korre-

liert als andere Scores, wie beispielsweise die Glasgow Coma Scale (GCS), vor allem weil sich in ihm Fröhschäden der SAB wie Hirndruckerhöhung oder transiente Durchblutungsstörungen niederschlagen [25]. Zudem ist der Hunt/Hess Score sehr weit verbreitet, dennoch gibt es auch hier Kritikpunkte und abgewandelte Scoring Systeme [26]. Insgesamt sind die Veränderungen den ICP und den CBF betreffend in den ersten Stunden nach SAB entscheidend für den neurologischen Status des Patienten welcher somit den entscheidenden prognostischen Faktor darstellt [27].

<b>Hunt/Hess Grad</b>	<b>Bewusstsein</b>	<b>Klinisches Bild</b>	<b>GCS</b>
<b>1</b>	wach	keine oder leichte Kopf- und Nackenschmerzen	15
<b>2</b>	wach	starke Kopf- und Nackenschmerzen, Meningismus	14 - 15
<b>3</b>	somnolent	leichtere fokale neurologische Defizite wie Paresen, Geföhlstörungen, Dysphasie	13 - 14
<b>4</b>	soporös	Halbseitenlähmung, Störungen von Kreislauf, Atmung, Temperaturregulation	7 - 12
<b>5</b>	komatös	Strecksynergismen, Dezerebrationszeichen,	3 - 6

**Abbildung 2:** Hunt/Hess-Skala: Einteilung des klinischen Zustands nach einer Aneurysmaruptur modifiziert nach Hunt/Hess [28]

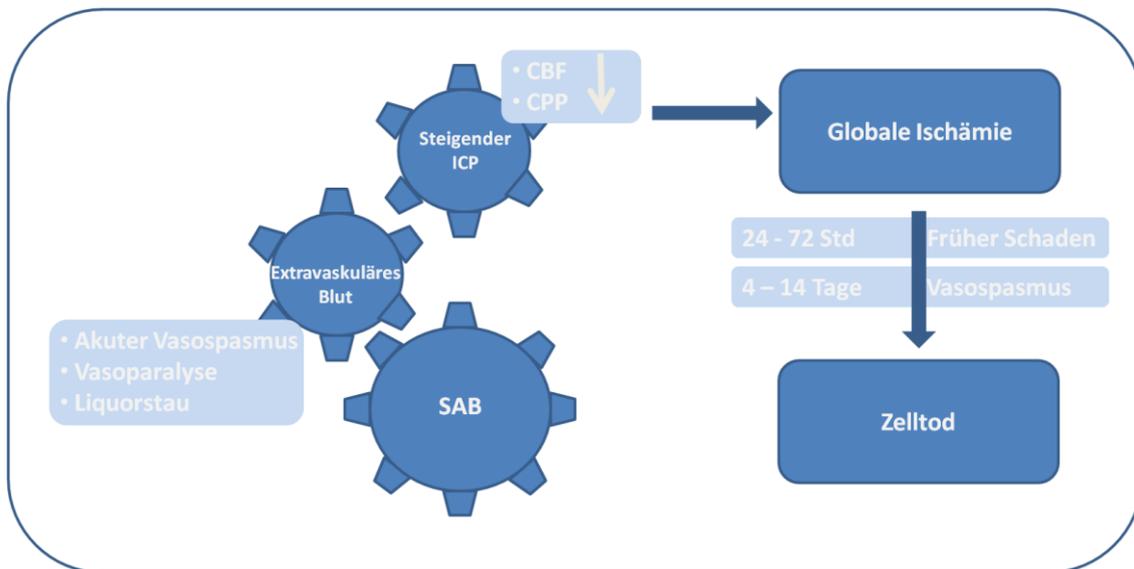
Weiterhin erfolgt anhand der Blutmenge und -verteilung in der kranialen Computertomographie eine Einteilung nach der Fisher-Skala [29]. Die Blutmenge im Subarachnoidalraum korreliert mit dem Risiko, einen Gefäßspasmus in einem hirnversorgenden Gefäß zu entwickeln. Patienten, die eine intrazerebrale oder intraventrikuläre Blutung und gleichzeitig eine Tamponade der basalen Zisternen erlitten haben, werden als Grad 3 gewertet, sie haben ein Vasospasmusrisiko von 96 %.

<b>Fisher Grad</b>	<b>Blutverteilung</b>	<b>Vasospasmus-Risiko</b>
<b>1</b>	Kein Blut sichtbar	18 %
<b>2</b>	Lokaler Blutfilm oder -clot	43 %
<b>3</b>	Zisternale Tamponade	96 %
<b>4</b>	Intrazerebrales oder intraventrikuläres Hämatom	40 %

**Abbildung 3:** Fisher-Skala [30]

Für die hohe Mortalität und Morbidität sind unterschiedliche Faktoren verantwortlich, die sich im Krankheitsverlauf in der Akut- und Sekundärphase finden, insbesondere verschiedene Arten der Durchblutungsstörung und eine metabolische Dysfunktion [31-33]. Mehrere Tage nach der SAB besteht die Gefahr von sekundären Vasospasmen und sekundären ischämischen Episoden [10]. Neben diesen sekundären ischämischen neurologischen Defiziten (delayed ischemic neurological deficits, DIND) spielen hier weiterhin Rezidivblutungen, Infektionen und intensivmedizinische Komplikationen eine Rolle [34].

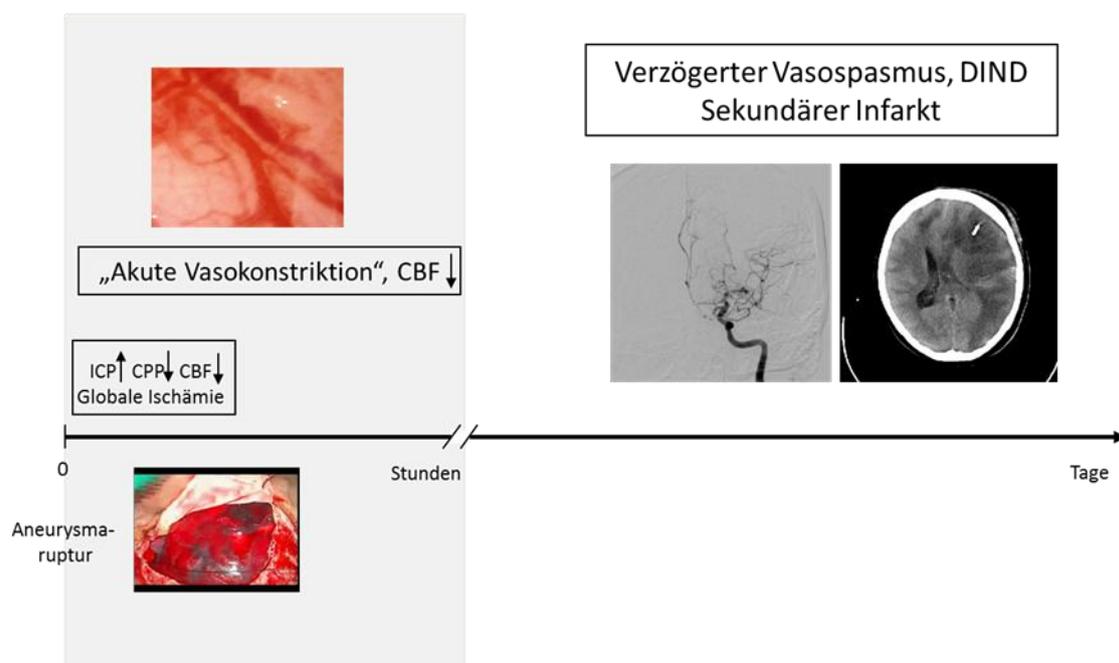
### 1.1.4 Pathophysiologie



**Abbildung 4:** Überblick über die Reaktionskette nach SAB. Nach einer SAB greifen unterschiedliche pathophysiologische Vorgänge ineinander und können so zu einer ischämischen Schädigung des Hirngewebes mit Zelltod führen. Das extravaskuläre Blut führt zu einem erhöhten Hirndruck (ICP) und dieser zu einem Absinken des zerebralen Blutflusses (CBF) und des zerebralen Perfusionsdruckes (CPP), somit kommt es zur globalen Ischämie, die letztlich im Zelltod mündet (nach Yuksel et al.) [35].

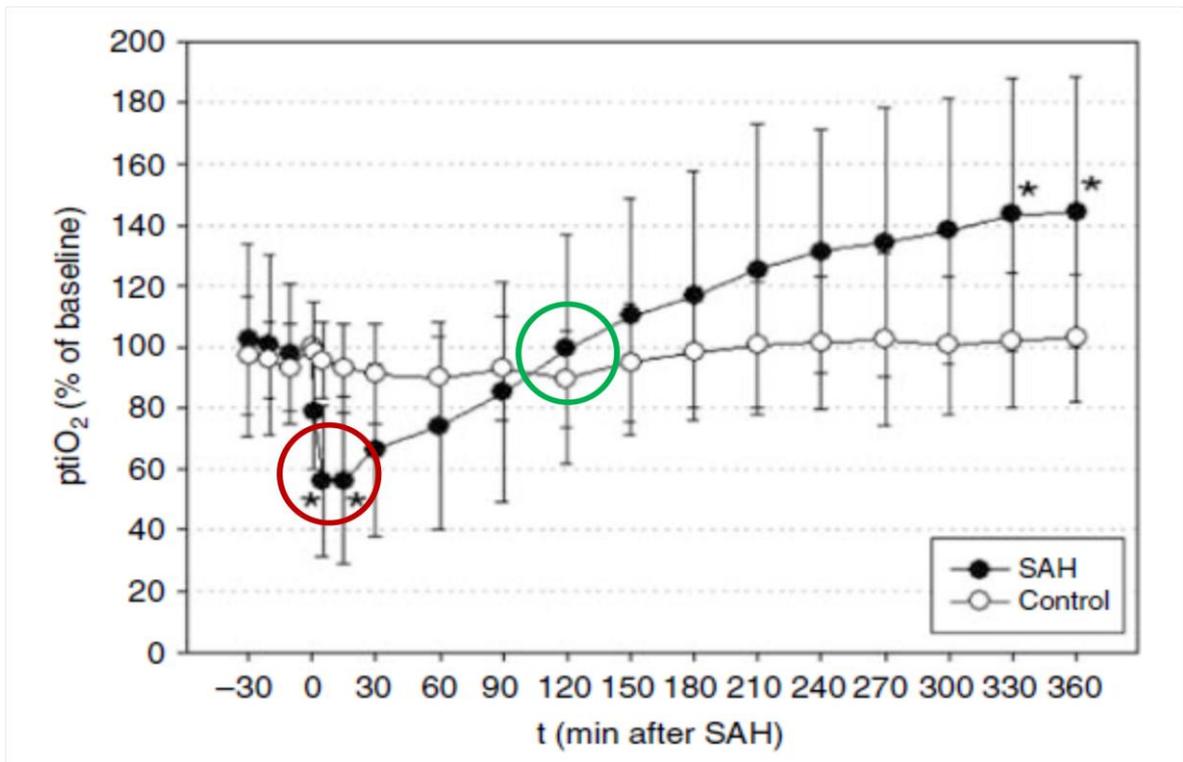
Mit der subarachnoidalen Blutung einhergehend kommt es durch das in den Subarachnoidalraum ausgetretene Blut zu einer unmittelbaren Erhöhung des Hirndrucks (ICP), sodass der zerebrale Perfusionsdruck (CPP) sinkt [33, 36]. Der CPP ist definiert als Differenz zwischen dem arteriellen Mitteldruck (MAP) und dem ICP ( $CPP = MAP - ICP$  [mmHg]) [37]. Der ICP fällt allerdings in den meisten Fällen wieder relativ rasch ab, so dass sich der CPP wieder erholt. Bereits in den ersten Minuten nach der SAB tritt jedoch zusätzlich eine globale Gefäßreaktion auf, die zu einer Minderperfusion beiträgt und auch nach Erholung des CPP weiter persistiert [38]. Dies ist kritisch, da sich eine klinisch relevante Einschränkung des Metabolismus bereits bei einer regionalen Hirndurchblutung von 20ml/100g/Min. einstellt [39]. In der Akutphase der SAB zeigen sich sehr früh, bereits ab zehn Minuten nach der SAB beginnend, mit einer

deutlichen Zunahme 24 Stunden nach der SAB, eine erhöhte Apoptoserate in Endothelial- und Parenchymalzellen sowie eine gesteigerte neuronale Nekrose [40], sodass schon sehr früh nach der Blutung ein akuter Schaden auftreten kann. Um die Reduktion der Hirndurchblutung auszugleichen, kommt es als Reaktion auf die Hirndrucksteigerung durch den Cushing-Reflex zu einer Steigerung des mittleren arteriellen Blutdrucks [41]. Einige Tage nach der SAB entwickeln sich häufig sekundäre Gefäßspasmen, die zu sekundären neurologischen Defiziten führen können [34].



**Abbildung 5:** Frühphase und Sekundärphase der SAB. Frühphase der SAB (grau hinterlegt) mit steigendem intrakraniellen Druck (ICP) und sinkendem zerebralen Perfusionsdruck (CPP) sowie sinkendem zerebralen Blutfluss (CBF); rechts davon die Sekundärphase nach einigen Stunden mit verzögertem Vasospasmus, sekundären ischämischen neurologischen Defiziten (delayed ischemic neurological deficits, DIND) und sekundären Infarkten [42].

In den letzten Jahrzehnten wurde insbesondere auf dem Gebiet des sekundären Vasospasmus nach einer SAB geforscht. Das Oligopeptid Endothelin-1, als einer der stärksten momentan bekannten Vasokonstriktoren, zeigte sich bei den Patienten in Liquor und Serum deutlich erhöht, die einen Vasospasmus und sekundäre neurologische Defizite entwickelten [43, 44]. Eine große klinische Multicenter-Studie zeigte, dass der Endothelin A-Rezeptorantagonist Clazosentan eine effektive Therapie der sekundären Gefäßspasmen darstellte, nicht aber zu einer Verbesserung des neurologischen Outcomes der Patienten führte [45, 46]. Seither rückt die Frühphase der SAB immer mehr in den Vordergrund der Forschung, da hier möglicherweise die Weichen für den weiteren Verlauf und neue Therapieoptionen gestellt werden könnten. Bereits 1977 beobachteten Grubb et al. bei Patienten eine signifikante Einschränkung der regional zerebralen Glukoseverwertung nach der SAB [47]. Westermaier et al. fanden 2009 eine deutliche Abnahme der Gewebesauerstoffsättigung nach experimenteller SAB auf 57 % des Ausgangswertes. Nach etwa 2 Stunden erreichte sie wieder den Ausgangswert, um dann nach 6 Stunden eine Gewebesauerstoffsättigung von 140 % des Ausgangswertes zu erreichen. Die rote Markierung in der Abbildung 6 zeigt den signifikanten Abfall der Gewebesauerstoffsättigung an, die grüne Markierung den Zeitpunkt nach 2 Stunden.



**Abbildung 6:** Gewebesauerstoffkonzentration (ptiO<sub>2</sub>) in % vom Ausgangswert in der Gruppe, in der eine SAB (SAH) ausgelöst wurde und in der Kontroll-Gruppe (control) nach Westermaier et al. [48] mit Erlaubnis von "Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism SAGE Publications", 03.03.2017

Diese Veränderungen sprechen für das Vorliegen einer Einschränkung der aeroben Glukoseutilisation. Des Weiteren wurden in der Frühphase (innerhalb der ersten 6 Stunden) nach einer SAB bereits Veränderungen der Laktat- und auch Pyruvatkonzentrationen mittels Mikrodialysesystem nachgewiesen, die ebenfalls auf eine ausgeprägte Störung des aeroben Glukosestoffwechsels schließen lassen [49]. Das Schlüsselenzym des aeroben Glukosestoffwechsels ist der Pyruvatdehydrogenasekomplex (PDHC) der es durch seine katalysierten Reaktionen möglich macht, Pyruvat effizient weiter zu verstoffwechseln [50]. Da Pyruvat auch beim Katabolismus verschiedener Aminosäuren entsteht, greift der PDHC somit auch in deren Metabolismus ein [51].

### 1.1.5 Therapie

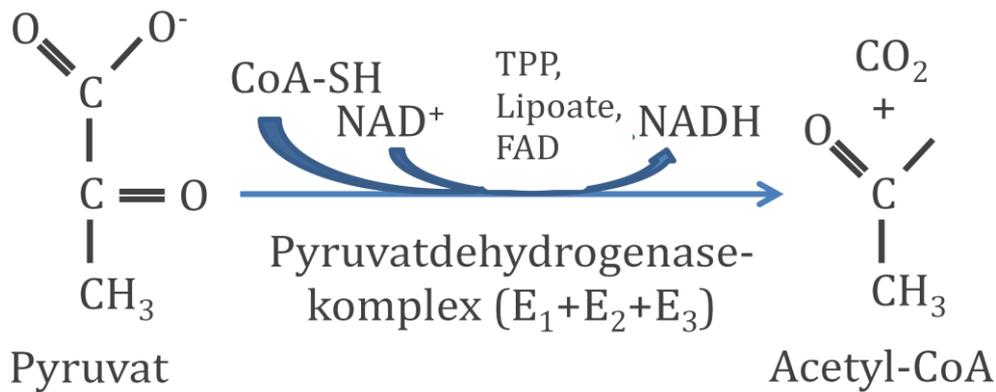
Da die SAB eine akute und lebensbedrohliche Erkrankung in allen Lebensaltern darstellt, ist eine schnelle Diagnostik und Therapie unverzichtbar. Die Deutsche Gesellschaft für Neurologie empfiehlt als Basismaßnahmen das Anstreben eines arteriellen Mitteldrucks von 60-90 mmHg. Auf diese Weise sollen sehr frühe Nachblutungen vermieden und gleichzeitig die zerebrale Blutversorgung ermöglicht werden. Weiterhin sollen Fieber und Hyperglykämie adäquat therapiert werden und eine Normovolämie sollte angestrebt werden [22]. Zur Therapie der SAB gehört die möglichst frühzeitige Versorgung des ursächlichen Aneurysmas [52]. Empfohlen wird eine Ausschaltung innerhalb der ersten 72 Stunden nach Blutungsereignis [22]. Die Ausschaltung kann einerseits durch das mikrochirurgische Gefäßclipping des Aneurysmas, andererseits auch durch ein endovaskuläres Coiling erfolgen. Des Weiteren spielt die Behandlung von Komplikationen der SAB eine entscheidende Rolle für das Outcome. Dazu gehört unter anderem die Anlage einer externen Ventrikeldrainage bei einem akuten Liquoraufstau durch die von subarachnoidalem Blut verlegten Liquorabflusswege. Bei sehr hohem intrakraniellen Druck kann auch eine chirurgische Intervention im Sinne einer Hemikraniektomie nötig werden, um eine mechanische Dekompression des Gehirns zu ermöglichen. Die orale Gabe des Calciumantagonisten Nimodipin bringt nach einer großen Metaanalyse einen Vorteil für Patienten mit einer aneurysmatischen SAB hinsichtlich der Entwicklung sekundärer ischämischer Defizite und des neurologischen Outcomes [53]. Für die intravenöse Gabe konnte dies nicht nachgewiesen werden [53], wobei Kronvall et al. in ihrer Studie keinen klinisch relevanten Unterschied zwischen der oralen oder der intravenösen Nimodipingabe verzeichnen konnten [54]. Weiterhin ist aber die Gabe von Nimodipin umstritten [55] und neuere Studien zeigen bei SAB-Patienten eine Wirksamkeit von intraarterieller Nimodipingabe gegenüber sekundärem Vasospasmus auf [56]. Westermaier et al. konnten 2010 in einer Studie mit 107 Patienten einen therapeutischen Effekt einer intravenösen Magnesiumgabe nachweisen. Es zeigte sich, dass eine hochdosierte intravenöse Magnesiumtherapie die zerebralen ischämischen Ereignisse nach SAB reduzieren kann und dass die Therapie die ischämische Toleranz gegenüber kritischer Hypoperfusion erhöht [57]. Dhar et al. stell-

ten 2012 in ihrer prospektiven Studie mit 38 Patienten den Nutzen einer induzierten Hypervolämie in den Vordergrund [58]. In einer Studie mit 20 Patienten kommen im Jahr 2015 Togashi et al. zu dem Ergebnis, dass eine Volumenexpansion ebenso wenig wie ein induzierter erhöhter Blutdruck zu einem besseren Outcome nach einer SAB führen [59]. Zudem wurde beschrieben, dass eine Aktivierung des Pyruvatdehydrogenasekomplexes durch synthetische Pyruvatdehydrogenase Kinase Inhibitoren unter ischämischen Bedingungen die myokardiale Funktion steigern kann [60] und dass die Aktivierung in insulinresistenten Tieren zu einem Absinken des Blutzuckerspiegels führen konnte [61]. Hier könnte eine weitere Option für ein neuroprotektives Eingreifen nach einer SAB liegen.

## 1.2 Pyruvatdehydrogenasekomplex (PDHC)

### 1.2.1 Aufbau

Der PDHC ist ein  $8,4 \times 10^6$  Dalton großes Enzym aus mehreren Untereinheiten [62], welches in den Mitochondrien der Zellen lokalisiert ist [63]. Der PDHC stellt den Übergang von der anaeroben Energiegewinnung im Zytosol der Zellen zum Zitronensäurezyklus und somit zur aeroben Energiegewinnung innerhalb der Mitochondrien sicher [64]. Der Enzymkomplex besteht aus den drei Untereinheiten E1, E2 und E3: die Pyruvat-Dehydrogenase (E1), die Dihydrolipoamid-Acetyltransferase (E2) und die Dihydroliponamid-Dehydrogenase (E3). Darüber hinaus sind für die Reaktion, in der Pyruvat zu Acetyl-CoA umgewandelt wird, fünf Coenzyme notwendig: Thiaminpyrophosphat (TPP=aktiviertes Vitamin B1), Liponsäure (Liponamid), Coenzym A, Flavin-Adenin-Dinukleotid (FAD) und Nicotinamidadenindinukleotid ( $\text{NAD}^+$ ) [63]. Die Abbildung 8 verdeutlicht die Reaktion mit den fünf Coenzymen.



**Abbildung 7:** Oxidative Carboxylierung von 1 Mol Pyruvat mit einer Energiebilanz von einem Mol  $\text{NADH}+\text{H}^+$ , einem Mol Acetyl-CoA und einem Mol  $\text{CO}_2$ ; CoA: Coenzym A; SH: Thiolgruppe; TPP: Thiaminpyrophosphat; FAD: Flavin-Adenin-Dinukleotid; NAD: Nicotinamidadenindinukleotid, nach [65]

### 1.2.2 Reaktion

In der im Zytosol ablaufenden Glykolyse entsteht Pyruvat [66]. Das Pyruvat wird in den Mitochondrien in mehreren Schritten durch den PDHC in Acetyl-CoA umgewandelt. Vom Pyruvat wird zunächst  $\text{CO}_2$  abgespalten und der Hydroxylrest des Pyruvats auf TPP, als Coenzym von E1, übertragen, wobei Hydroxyethyl-TPP entsteht. Der Hydroxyethylrest wird zu einem Acetylrest oxidiert und auf Liponamid übertragen. So entsteht Acetylliponamid. Die Dihydroliponamid-Acetyltransferase transferiert den Acetyl-Rest von Acetylliponamid auf Coenzym A. In diesem Schritt übernimmt sie zwei Wasserstoffionen, die an ein FAD unter  $\text{FADH}_2$  - Entstehung abgegeben werden. Im letzten Schritt übernimmt ein  $\text{NAD}^+$  zwei  $\text{H}^+$  zur Rückgewinnung von FAD, welches dann für neue Zyklen und andere Stoffwechselwege zur Verfügung steht. Bei der beschriebenen Reaktion fallen folgende Produkte an: Acetyl-CoA,  $\text{CO}_2$  und  $\text{NADH}+\text{H}^+$  [62, 63].

### 1.2.3 Enzymaktivität

Der PDHC unterliegt einer strengen Regulation, auf die unterschiedliche Faktoren Einfluss nehmen. Die Aktivität des Enzymkomplexes wird durch reversible Phosphorylierung gesteuert [63]. Die Regulation der Aktivität des PDHC erfolgt durch Kinasen und Phosphatasen [51].

#### 1.2.3.1 Aktivierung

Aktiv ist der Komplex, wenn er dephosphoryliert vorliegt, phosphoryliert ist er inaktiv [63]. Aktivierend wirken die Pyruvatdehydrogenase-Phosphatasen PDP-1 und -2, die den PDHC dephosphorylieren. Sie werden durch einen hohen intrazellulären Calciumspiegel und eine hohe Magnesiumkonzentration im Zytosol in ihre aktive Form überführt. Eine hohe Konzentration dieser Stoffe begünstigt somit eine aerobe Energiegewinnung mit Hilfe des aktivierten PDHC [62]. Über eine Hemmung der Pyruvatdehydrogenase-Kinasen (siehe 1.2.3.2) durch ADP und auch  $\text{Ca}^{2+}$  kann es ebenfalls zu einer Aktivitätssteigerung des PDHC kommen [62]. Eine mögliche therapeutische Intervention könnte hier eine Stimulation der PDHC-Aktivität sein. Über Hemmung der Pyruvatdehydrogenase-Kinasen (siehe 1.2.3.2) mit Dichloracetat, welches bei Patienten mit PDHC-Verlust gegeben wird, konnte eine Aktivitätssteigerung des PDHC erreicht werden [67].

#### 1.2.3.2 Hemmung

Eine Hemmung des PDHC wird durch die Pyruvatdehydrogenase-Kinasen PDK1-4 herbeigeführt, die eine Phosphorylierung des Komplexes an drei Stellen der E1-Untereinheit durchführen. PDK werden aktiviert durch eine hohe Konzentration an Acetyl-CoA und  $\text{NADH}+\text{H}^+$ , deren Konzentration bei steigender aeroben Energiegewinnung zunimmt [62], wobei das Vorhandensein beider Substanzen in in vitro Versuchen einen additiven Effekt aufweist [68]. Die PDK2 scheint die Kinase mit dem größten Einfluss zu sein und findet sich ubiquitär im Körper [69]. Acetyl-CoA und  $\text{NADH}+\text{H}^+$  wirken

auch im Sinne einer klassischen Produkthemmung direkt hemmend auf den PDHC [63]. Auch durch ATP, welches mit steigender Konzentration eine ansteigende und irgendwann ausreichende Energieversorgung signalisiert, kommt es zu einer Aktivitätsminderung des PDHC [62]. Des Weiteren führt ein Versorgungsmangel, der eine Bereitstellung der nötigen Metaboliten für die aerobe Energiegewinnung nicht gewährleistet, zur Aktivierung der PDK und somit zu einer Inaktivierung des PDHC. Mit einer Hemmung des PDHC geht eine Erhöhung der intrazellulären Pyruvatkonzentration einher, was den anaeroben Abbau durch die anaerobe Glykolyse zur Folge hat. Zum einen ist dadurch eine erheblich geringere Energieausbeute bedingt, die nur noch 2 Mol ATP, statt 32 Mol ATP liefert [62], zum anderen steigen die Konzentrationen der Nebenprodukte intrazellulär an. Da Laktat eines der Nebenprodukte der anaeroben Glykolyse ist [70], bildet sich unter einer anaeroben Energiegewinnung eine Laktatazidose aus [71], wie es auch im tierexperimentellen Modell an Ratten nach globaler Ischämie gezeigt wurde [72]. Besteht ein pH-Wert von ca. 6 treten im Gehirn irreversible Zellschäden auf [73].

### 1.3 Sauerstoffsättigung

Eine ausreichende Sauerstoffsättigung im Gehirn ist für eine suffiziente Energieversorgung der vulnerablen Zellen essentiell. Nur über eine ausreichende Blutzufuhr, die beim Menschen bei ca.  $44,4 \pm 6,5$  ml pro 100 g Hirngewebe pro Minute liegt [74], kann der Sauerstoffbedarf gedeckt werden. Als normaler Sauerstoffpartialdruck im Hirngewebe werden Werte zwischen 25 und 35 mmHg genannt [75]. Im Tierexperiment konnte eine Reduktion der Gewebesauerstoffsättigung nach SAB-Induktion auf 57 % des Ausgangswertes gezeigt werden. Nach zwei Stunden wurde das Ausgangsniveau wieder erreicht, nach sechs Stunden jedoch erreichte die Sättigung dann Werte von  $\geq 140$  % des Ausgangsniveaus [48]. Hoffman et al. fanden in ihren Versuchen, dass es nach einer SAB intrakraniell zu Perioden mit geringerer Gewebesauerstoffsättigung kommt, auch wenn der zerebrale Perfusionsdruck wieder bei Normalwerten liegt [76].

#### 1.4 Intrazerebrale Hyperglykämie

Im Gehirn kommt es nach einer SAB zu Perioden mit relativer Hyperglykämie [77]. Diese erhöhte Glukosekonzentration spricht dafür, dass die Zellen nicht in der Lage sind, diese abzubauen. Eine signifikante mitochondriale Funktionseinschränkung insbesondere der Atmungskette kann dafür sorgen, dass eine ausreichende Energieversorgung der Zellen nicht mehr möglich ist [78]. Kann die oxidative Phosphorylierung in den Mitochondrien nicht mehr ablaufen, findet nur noch ein anaerober Glukoseabbau statt: die anaerobe Glykolyse. Als Nebenprodukt fällt hier pro Mol Pyruvat ein Mol Laktat an, welches das Schlüsselenzym der anaeroben Glykolyse, die Phosphofruktokinase, hemmt. So kommt es nach einiger Zeit auch zur Einschränkung der anaeroben Glykolyse. Die Konsequenz ist die Akkumulation der Glukose und folglich ein Energiemangel des Gehirns. Als weitere Folge steigt die H<sub>2</sub>O-Konzentration intrazellulär an, was zum Anschwellen der Zellen und somit zur Hirndrucksteigerung führt. Die ansteigende Wasserkonzentration in den Zellen ist durch eine Funktionseinschränkung der Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase Aktivität verursacht, weil die ATP-Konzentration durch den mangelnden Glucoseabbau unzureichend ist [77].

#### 1.5 Ischämie

Zerebrale Ischämie tritt immer dann auf, wenn das Sauerstoff- und Substratangebot im Gehirn nicht den metabolischen Bedürfnissen gerecht wird [79]. Normalerweise wird das Gehirn mit 20 % des Herzzeitvolumens versorgt, um den hohen Energiebedarf zu decken [77]. Zusätzlich wird über Autoregulation der lokale zerebrale Blutfluss dem lokalen Bedarf angepasst [80]. Von Valadka et al. wird sogar angegeben, dass nach schwerem Schädelhirntrauma die Mortalität mit der Dauer eines Sauerstoffpartialdrucks von 15 mmHg oder dem Auftreten von einem Sauerstoffpartialdruck von unter 6 mmHg [81], bei Normalwerten zwischen 25 und 35 mmHg [75], steigt.

## 1.6 Fragestellung

In den letzten vier Jahrzehnten war vor allem die Sekundärphase der SAB und der damit einhergehende Vasospasmus zentraler Teil der wissenschaftlichen Forschung [38, 82-87]. Dies hat zu unterschiedlichen und auch effektiven Behandlungsmöglichkeiten des Vasospasmus geführt. Die daraus entstandenen Therapieoptionen konnten allerdings zu keiner signifikanten Verbesserung des Outcomes nach SAB führen [88]. Auch das neurologische Outcome hat sich nicht signifikant verbessert [89]. Sehba et al. weisen in ihrer Untersuchung aus dem Jahr 2000 bereits auf die Frühphase der SAB mit Veränderungen direkt nach der SAB hin [90]. Außerdem ist der neurologische Zustand unmittelbar nach der SAB der aussagekräftigste Prädiktor für das neurologische Outcome.

Übergeordnetes Thema der Arbeitsgruppe ist die Untersuchung pathophysiologischer Vorgänge in der Akutphase der SAB sowie neuroprotektiver Maßnahmen in dieser Phase. In diesem Rahmen konnte gezeigt werden, dass unmittelbar nach experimenteller SAB der Sauerstoffpartialdruck im Hirngewebe deutlich absinkt, was auf die initiale Hirndruckerhöhung und globale Ischämie zurückzuführen ist. Im Verlauf der folgenden Stunden erholt sich der Sauerstoffpartialdruck wieder und übersteigt schließlich den Ausgangswert. Im gleichen Zeitraum bildet sich eine moderate Akkumulation von Laktat und auch von Pyruvat aus. Insgesamt spricht diese Konstellation dafür, dass mit Erholung der Hirndurchblutung in den Stunden nach der SAB auch die adäquate Sauerstoffversorgung des Hirngewebes wieder stattfindet, dass der angelieferte Sauerstoff aber nicht verbraucht werden kann, da die aerobe Utilisation nicht funktioniert. Letztendlich könnte dies möglicherweise ein entscheidender Mechanismus für den Sekundärschaden nach SAB sein, der möglicherweise einer neuroprotektiven Therapie zugänglich ist. Im Zentrum der Untersuchungen dieser Arbeit steht das Schlüsselenzym der aeroben Energiegewinnung: der Pyruvatdehydrogenasekomplex; und insbesondere die Aktivität des Pyruvatdehydrogenasekomplexes in der Frühphase nach der SAB. Die oben genannten Voruntersuchungen aus der eigenen Arbeitsgruppe könnten dafür sprechen, dass dieser Enzymkomplex nach einer SAB gehemmt oder geschädigt ist. Im Gehirn von Ratten (SAB- und Kontroll-Tiere) wurde die Aktivität des Enzymkomplexes

untersucht, um mögliche Veränderungen der Enzymaktivität zu identifizieren und somit einen möglichen Angriffspunkt für eine zielgerichtete primäre Therapie der SAB zu finden.

## **2 Material und Methoden**

### 2.1 Operation der Ratten

#### 2.1.1 Tiere

Für die Operationen wurden 18 männliche Sprague-Dawley Ratten mit einem Körpergewicht von 250-300 g verwendet (Harlan Winkelmann, Borchem). Die Tiere wurden randomisiert in eine SAB- und eine Kontroll-Gruppe. Alle Versuchsschritte wurden innerhalb §8 Abs. 1 des Tierschutzgesetzes durch die Regierung von Unterfranken genehmigt (AZ 55.2-2531.01-16/10).

#### 2.1.2 Vorbereitung und Überwachung

Die Narkoseeinleitung der Ratten erfolgte unter Insufflation eines Isofluran/Luft-Gemischs mit 5 % Isofluran (Forane, Isoflurane, Abbott, ABBOTT PARK, IL, USA). Anschließend wurde die endotracheale Intubation unter Verwendung einer 16 G Braunüle (Sicherheitsverweilkanüle mit Inj. Spot 16G, B.Braun, Melsungen AB, Melsungen) als Tubus durchgeführt. Daraufhin wurden die Ratten an das Beatmungsgerät (Animal Respirator Typ 994600, RHEMA Labortechnik, Hofheim Ts.) angeschlossen und zunächst mit einem Raumluft-Sauerstoff-Gemisch (FiO<sub>2</sub> 30 %) und Isofluran mit einer Konzentration von 4 Volumenprozent beatmet. Nach Beendigung der operativen Maßnahmen wurde die Isoflurandosis auf 2-2,5 Volumenprozent reduziert. Über einen medianen, ca. 2 cm langen Hautschnitt wurde die Schädelkalotte freigelegt. Die weitere Präparation erfolgte unter dem Operationsmikroskop (ZEISS, f170, System contraves). Zur intraoperativen Überwachung des Hirndrucks und der Hirndurchblu-

tung wurden nun drei Bohrlöcher mit einem Dentalbohrer (Kato Typ 900, Elektrotechnisches Werk GmbH, Leutkirchen) angelegt. Das Bohrloch zur Hirndruckmessung wurde rechts vor der Koronarnaht paramedian gebohrt, wobei sowohl der Knochen als auch die Dura mater eröffnet werden mussten. Die beiden Bohrlöcher für die Durchblutungsmessung mittels Laser-Doppler Sonden (Laser Blood Flow Monitor MBF 3D, Moor Instruments England) wurden beidseits vor der Lambdanaht, etwas lateraler als das vordere Bohrloch, angelegt. Dies geschah ohne Verletzung der Dura mater. Am vorderen Bohrloch wurde die Dura mater bipolar koaguliert und perforiert (Malis Bipolar Coagulator, Codman and Shurtleff Inc., USA), um eine intrazerebrale Hirndruckmessung (Hirndrucksonde, Firma Integra Neuro Science, Camino Laboratories Dan Diego, CA 92121 serial 3023) anlegen zu können. Anschließend wurde das Tier in Rückenlage gebracht und mittels atraumatischer Ear-bars an einem stereotaktischen Rahmen befestigt. Der Oberkiefer wurde zusätzlich in eine Zahnklemme eingespannt, um eine ungestörte intraoperative Überwachung zu garantieren. Des Weiteren wurde eine Temperatursonde (KS 40-1 universal) über eine kleine präaurikuläre Inzision linksseitig zur Schädelbasis unterhalb des Musculus temporalis vorgeschoben. Die Temperatur an der temporalen Schädelbasis entspricht der intrazerebralen Temperatur [91, 92]. In Rückenlage wurden nun die Sonden zur bilateralen intrazerebralen Messung des Hirndrucks und die Laser-Doppler-Sonden zur Messung des lokalen zerebralen Blutflusses (LCBF) mit Hilfe von stereotaktischen Mikromanipulatoren in den Bohrlöchern positioniert. Die Werte wurden kontinuierlich aufgezeichnet und elektronisch dokumentiert (LabView for Macintosh, National Instruments, München).

### 2.1.3 Intraarterielle Blutdruckmessung

Mit einem Skalpell wurde der Schwanz der Ratten median über ca. 1,5 cm inzidiert und die Schwanzarterie freipräpariert, damit sie mindestens über eine Strecke von 1 cm unterminierbar war. Mit Hilfe zweier mikrochirurgischer Clips wurde die Arterie abgeklemmt, sodass der Katheter (Polyethylenschlauch 0,5 X 1,00 mm, A. Hartenstein REF 800/100/160) mit dem schrägen Anschnitt nach oben von distal bis zum Clip in die Ar-

terie geschoben werden konnte. Dann wurde die distal vorgelegte Ligatur (chirurgisches Nahtmaterial, resorbierbar, Coatech VICRYL, Polyglactin 7-0, ETHICON) zugezogen. Nach Entfernen des Clips wurde der Katheter bis unter die Faszie weiter in der Arterie vorgeschoben und dann distal am Schwanz fixiert. Anschließend wurde die erste Blutgasanalyse (Rapidpoint 405, Automatic QC, Siemens Healthcare Diagnostics Inc., NY, USA) mit einer Kapillare (Multi-Cap, 140µl, Siemens Denmark) durchgeführt. Danach wurde das Katheterende wieder mit dem Infusionsschlauch konnektiert und mit Sterofundin ISO (B. Braun, Melsungen) gespült bis der sichtbare Katheterschlauch wieder blutleer war. Die intraoperative, intraarterielle Blutdruckmessung erfolgte am Hellige Servomed Gerät (Anlagen Nummer 12030271, Hellige GmbH, Freiburg).

#### 2.1.4 Auslösen der SAB

Zum Auslösen der SAB wurde an der rechten Halsseite eine paramediane Längsinzision angelegt. Zwischen M. sternocleidomastoideus und unterer Zungenbeinmuskulatur wurde die zervikale Carotisbifurkation aufgesucht. Die A. carotis externa wurde an ihrem distalen Ende ligiert und abgehende Äste wurden bipolar koaguliert. Danach wurde sowohl die A. carotis communis als auch die A. carotis interna temporär geclippt. Dies ermöglichte eine blutarme bis blutfreie Inzision der A. carotis externa ca. 6 mm distal der Carotidgabel. Über diese Inzision wurde nun ein ca. 4 cm langer monofiler, nicht Nylonfaden (PROLENE 3-0 ETHICON, INC.) nach proximal in die Arterie eingeführt und mit einer weiteren Ligatur an der A. carotis externa gesichert. Die beiden Clips wurden entfernt und die A. carotis externa distal der Inzision nun komplett durchtrennt. Der Stumpf der A. carotis externa wurde gemeinsam mit dem darin fixierten Nylonfaden nach kaudal umgeklappt, um den spitzen Winkel zwischen A. carotis externa und A. carotis interna aufzuheben und den Faden über die A. carotis interna nach intrakraniell vorschieben zu können. Nach ca. 20 mm Vorschub zeigte sich ein deutlicher Abfall des ipsilateralen Laser-Doppler-Flusses, der kontinuierlich gemessen wurde. Dieser Abfall bewies die korrekte Lage des Fadens vor dem Abgang der A. cerebri media. Ein weiteres Vorschieben des Fadens um ca. 3 mm führte zum Auslösen

einer SAB im Bereich der A. cerebri anterior. Verifiziert wurde die bestehende Blutung durch einen bilateralen Abfall des Laser-Doppler-Flusses sowie durch den plötzlichen Anstieg des intrakraniellen Drucks. Der Faden wurde nach Auslösen der SAB sofort wieder nach extrakraniell und in den Stumpf der A. carotis externa zurückgezogen. Hierdurch war eine sofortige Reperfusion der A. carotis interna gegeben, die den realen Vorgängen eines rupturierten Aneurysmas entsprach. Das temporäre Clipping der Aa. carotis communis und interna beanspruchte etwa 3 Minuten.

#### 2.1.5 Präparation des Hippocampus

Die Ratten, bei denen die PDHC-Aktivität mittels ELISA-Reader gemessen werden sollte, wurden in tiefer Isoflurannarkose durch Dekapitation getötet und die Gehirne wurden umgehend entnommen. Hierzu wurde das Gehirn, nach Eröffnen der Schädelkapsel und der Dura mater, stumpf von der Schädelbasis gelöst. In einer mit Hilfe eines Kühlakkus gekühlten Petrischale wurde unter dem Operationsmikroskop (Leica MZ 75, KL 1500 LCD) der Kortex und der Hippocampus der rechten Hemisphäre freipräpariert. Mit Hilfe zweier Hirnspatel (Hirnspatel, Firma Martin 24-713-13) wurden die Hemisphären am Interhemisphärenspalt voneinander getrennt. Soweit wie möglich wurde der Kortex der rechten Hemisphäre nach lateral und basal freipräpariert. Im dorsalen Drittel des Großhirns schwingt sich halbmondförmig der Hippocampus von medial nach dorsokaudal. Er wurde ebenfalls mit Hilfe der Hirnspatel vom übrigen Hirngewebe entfernt. Ohne Riech- und Kleinhirn wurde der Rest dieser Hemisphäre ohne Kortex und ohne Hippocampus als eine Probe verwendet. Eine eigene Probe stellte die unversehrte linke Hemisphäre dar. Die Gewebeproben wurden separat gewogen (KERN ALS 120-4, Kern und Sohn GmbH, Balingen), in Röhrchen (Microschraubröhre 2 ml, PP, Sarstedt, Nümbrecht) gegeben, dann in Flüssigstickstoff tiefgefroren und in einem -80°C-Gefrierschrank (Tiefkühlschrank TS 80-100, FRYKA Kältetechnik, Esslingen) gelagert.

## 2.2 Immunhistochemie

### 2.2.1 Histologische Schnitte

#### 2.2.1.1 Materialien

4 %iges Paraformaldehyd: 20g PFA, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim; gelöst in 500 ml PBS

Ethylalkohol (EtOH): EtOH, absolute > 99,8 %, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

Chloroform: Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

#### 2.2.1.2 Gewebeaufbereitung und Schnitte

Die Ratten, deren Gehirne für die Paraffinschnitte verwendet wurden, wurden 180 Minuten nach Auslösen der SAB mit 4 %igem Paraformaldehyd perfusionsfixiert. Anschließend wurden das Klein- und das Riechhirn mit Hilfe eines Skalpelles vom Präparat entfernt. Über Nacht wurde das Gewebe im Entwässerungsautomaten (SHANDON Citadel 100 Wax BATH, serial Number 00033, UK) entwässert und für die Paraffinblockbildung vorbereitet. Hier waren die Gehirne für jeweils 45 Minuten in 50 % EtOH, 70 % EtOH, 80 % EtOH und 96 % EtOH. In 100 % EtOH lagen die Gewebeproben zwei Mal für je 60 Minuten; danach folgten zwei Bäder für je 30 Min mit 100 %igem EtOH und Chloroform im Verhältnis 1:1. Anschließend wurden die Gewebeproben in zwei Bäder mit Chloroform absolut jeweils für 30 Min. gegeben und zum Schluss folgten für je 120 Min. zwei Bäder mit Flüssigparaffin. Nach Durchlaufen dieser Schritte wurden die Gehirne zu Paraffinblöcken gegossen (Tissue block System TBS 88, Dispenser und Cool unit, medite, Medizintechnik). Über Nacht härteten die Paraffinblöcke bei Raumtemperatur aus und wurden dann mit dem Mikrotom (Microtome Holder No. 2405 Medicak Division, Osaka, Japan) in 5 µm dicke Schnitte geschnitten. Nach dem Trocknen der Gewebeschnitte auf den Objektträgern für mindestens 24 Stunden bei 37°C im Wärmeschrank (Modell 400, Memmert GmbH und Co KG, Schwabach) konnten die Präparate für die immunhistochemische Färbung verwendet werden.

## 2.2.2 Immunhistochemische Färbung

### 2.2.2.1 Materialien

Xylol:	Xylenes, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
EtOH:	EtOH, absolute > 99,8 %, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Aqua dest.:	Aqua steril, B. Braun, Melsungen
PBS:	NaCl 80g, KCl 2g, Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 11g, KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 2g pH 7,2-7,4 Gebrauchslsg. 1:10 mit Aqua dest.
Citratpuffer 10 mM:	3 ml Stock Solution A 1 L Citric acid 21,01g plus 17 ml Stock Solution B 1 L Sodiumcitratedehydrate 29,41g pH 6 Verdünnung 1:10 mit Aqua dest.
Normal Horse Serum:	Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc.
Triton X-100:	Aqueoussolution, 10 %, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Anti-Pyruvatedehydrogenase antibody:	Anti-Pyruvate dehydrogenase E2/E3bp antibody [13G2AE2BH5] (ab110333), Mouse monoclonal, Abcam
Methanol:	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> :	Hydrogen peroxide 30 %, Merck KGaA, Darmstadt
AntiMouselgGAntikörper:	Vector Laboratories, Inc., Burlingame CA 94010 BA-2001
Avitin-Biotin-Peroxidase-Komplexmethode (ABC-Komplex):	A: Ultra Reagent A; Avidin, Specially Purified

B: Ultra Reagent B; Biotinylated Horseradish Peroxidase

A und B: ThermoScientific, Rockford, USA

3,3-Diaminobenzidin-tetrachloride dihydrate-(DAB)-Tablette:

Kem-En-TecDiagnostics A/S, Taastrup, Denmark

Deckgläser: 24 X 50 mm, R. Langenbrinck Labor- und Medizintechnik,  
Emmendingen

Kleber: Vitro-Clud, R. Langenbrinck Labor- und Medizintechnik,  
Emmendingen

#### 2.2.2.2 Färbung

Zum Entparaffinieren wurden die Schnitte für 15 Minuten in Xylol gegeben und danach für jeweils zwei Minuten in absteigender Alkoholreihe, 2x100 % EtOH, 2x96 % EtOH, 90 % EtOH, 80 % EtOH, 2x70 % EtOH, 50 % EtOH bis 2x Aqua dest. weiterbehandelt. Anschließend wurden die Objektträger zweimal für 10 Min. in PBS gewaschen. Der nächste Schritt bestand im dreimaligen Aufkochen der Objektträger in Citratpuffer in der Mikrowelle (Severin Microwave 800 Art. MW 7800, Typ 7800). Danach wurden die Objektträger für 5 Min. in Aqua dest. gegeben und somit abgekühlt, bevor sie wieder zweimal für 10 Min. in PBS gewaschen wurden. Mit einem Fettstift (Dako Pen, DakoDenmark A/S, Glostrup) wurden die Gewebeschnitte vorsichtig umrandet, sodass für die darauf zu gebenden Lösungen eine äußere Barriere bestand. Die Präparate wurden zur Blockierung mit 10 %igem Horse Serum in PBS mit 0,2 % Triton X beträufelt und bei Raumtemperatur (RT) in einer feuchten Kammer für eine Stunde inkubiert. Die Lösung wurde dann von den Schnitten abgegossen. Anschließend wurde der 1. Antikörper, Anti-Pyruvatedehydrogenase E2/E3bp antibody, gegen den Pyruvatdehydrogenasekomplex in den Gewebeschnitten, in der Verdünnung 1:1000 µl auf die Schnitte pipettiert. Erneut in der feuchten Kammer, jedoch bei 4°C, inkubierte der 1. Antikörper über Nacht. Am zweiten Tag wurde die überstehende Lösung von

den Schnitten abgekippt und die Objektträger wurden zweimal für 10 Minuten in PBS gewaschen. Danach wurden die Präparate mit Methanol + Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) (100:1) beträufelt, welches für 20 Minuten unter dem Abzug einwirkte. Erneut wurden die Schnitte zweimal für zehn Minuten in PBS gewaschen. Der nächste Schritt erfolgte mit dem 2. Antikörper, ein Anti Mouse IgG-Antikörper, in PBS und Horse Serum gelöst. Dieser wurde auf die Schnitte pipettiert und wirkte für 1 Stunde bei Raumtemperatur. Es folgte ein weiterer Waschschrift, zweimal zehn Min. PBS. Danach wurden die Präparate für eine Stunde bei RT mit einem ABC-Komplex inkubiert. Durch die Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplexmethode (ABC-Komplex) wurden pro Gewebeantigen, in diesem Fall der Pyruvatdehydrogenasekomplex, über die Antikörper mehrere Peroxidasemoleküle angelagert [93]. Es folgte ein erneuter Waschschrift, zweimal 10 Minuten PBS. Währenddessen wurde die 3,3-Diaminobenzidin-(DAB)-Lösung angesetzt. Hierfür wurde in 10 ml Aqua dest. eine Tablette DAB gegeben und diese auf dem Magnetrührer (Heidolph MR 3001 K 800W) für ca. 10 Minuten gerührt und damit aufgelöst. Kurz vor Verwendung wurden 10  $\mu$ l 30 %iges  $H_2O_2$  hinzugegeben und tropfenweise wurde die DAB-Lösung, unter dem Abzug, auf die Präparate gegeben. Die Lösung wurde für ca. 3 Min. auf den Schnitten belassen. Die zuvor durch den ABC-Komplex über die Antikörper am Pyruvatdehydrogenasekomplex gebundene Peroxidase wandelt DAB mit  $H_2O_2$  zu einem braunen Farbprodukt um [93]. Um die Entwicklung zu stoppen wurden die Objektträger in Aqua dest. gegeben. Nun wurden die Objektträger durch eine aufsteigende Alkoholreihe für je 2 Min. in 2 x 50 % EtOH, 75 % EtOH, 2 x 95 % EtOH, 2 x 100 % EtOH und Xylol gehängt. Danach wurden die Gewebeschnitte mit Deckgläsern beklebt.

### 2.2.3 Auswertung der Immunhistochemie

Die immunhistochemischen Färbungen des PDHC von Kontroll- und SAB-Tieren wurden semiquantitativ von zwei unabhängigen Untersuchern und bezüglich Operation (Kontroll- oder SAB-Tier) verblindet ausgewertet. Die Auswertung der Immunhistochemie erfolgte in 100- und 400facher Vergrößerung. Es wurde die gesamte Hemisphäre ange-

schaut und der CA1 Hippocampusbereich im Speziellen jeweils von drei Kontroll- und drei SAB-Tieren. Der CA1 Hippocampusbereich wurde in die Auswertung der Immunhistochemie eingeschlossen. Die Intensität der Färbung wurde mit negativ (0), schwach (1), mäßig (2) oder stark (3) bewertet.

#### 2.2.4 Messung der Aktivität des PDHC im Rattengehirn

##### 2.2.4.1 Materialien

PBS: NaCl 80g, KCl 2g, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 11g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2g pH 7,2-7,4  
Gebrauchslsg. 1:10 mit Aqua dest.

Coomassie Protein Assay Reagent:

Thermo Scientific, Rockford, USA

PDH Microplate Assay:

Abcam

20X Buffer, Part/Lot# GR 153128-4

Detergent, Part/Lot# 8201088/F1822

20X Reagent Mix, Part/Lot# 8201018

5X Stabilizer, Part/Lot# 8209703

100X Coupler, Part/Lot# 8209702/F0425

100X Reagent Dye, Part/Lot# 8209701/F1825

96-well microplate, Part/Lot#8209200/F1826

Um die Aktivität der PDHC in den verschiedenen Hirnabschnitten zu bestimmen, wurde das Pyruvatedehydrogenase Enzyme Activity Microplate Assay Kit (abcam, ab 109902) verwendet. Zunächst wurde das bei -80 °C tiefgefrorene Gewebefragment gewogen (KERN ABJ, Electronic Balance, Typ ABJ 220-4M, KERN und Sohn GmbH). Das Gewebe wurde dann entsprechend den Herstellerangaben für den Microplate Assay gelöst. Die

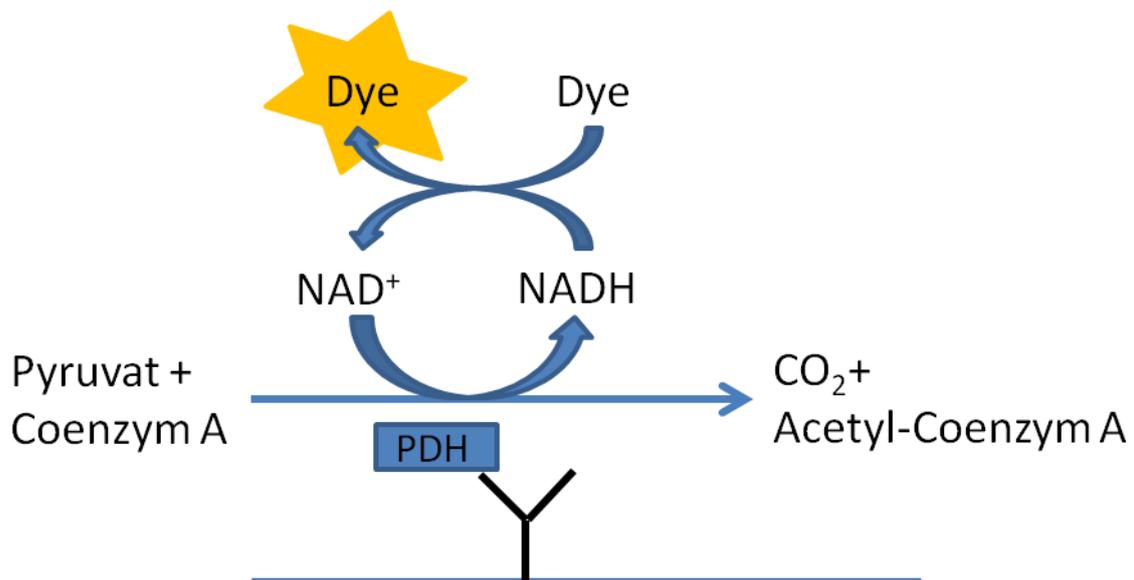
entsprechende Konzentration wurde erreicht bei einer Pufferzugabe von dem Vierhundertstel des Gewebegewichtes in  $\mu\text{g}$  pro  $\mu\text{l}$ .

**Tabelle 1:** Beispiele der Mengen an Puffer, die für die Gewebehomogenisierung eingesetzt wurden

Gewebegewicht	Umrechnung	Puffermenge
191.000 $\mu\text{g}$	: 400 =	477,5 $\mu\text{l}$
62.400 $\mu\text{g}$	: 400 =	156 $\mu\text{l}$
65.400 $\mu\text{g}$	: 400 =	163,5 $\mu\text{l}$
68.200 $\mu\text{g}$	: 400 =	170,5 $\mu\text{l}$

Mithilfe eines Plastikstößels (Mikropistill, Typ Standard, einseitig verwendbar, A. Hartenstein) in einer 2 ml Plastikzentrifuge (Safe Seal Micro tube 2 ml, PP REF 72.695, Sarstett, Nümbrecht) auf Eis wurde das Gewebe zunächst manuell zerkleinert, um es dann mit dem Dispergierstab (MICCRA D-9, Digitronic Serial No. 40434, ART Prozess- und Labortechnik GmbH und CoKG) für zweimal 20 Sekunden weiter zu homogenisieren (in der Zwischenzeit auf Eis gekühlt). Der Dispergierstab wurde zwischen den verschiedenen Proben mit DEPC-Wasser gereinigt (DEPC-treated Water, Ambion the RNA Company). Die weitere Verarbeitung des Homogenisates erfolgte folgendermaßen: Zunächst Zentrifugation in der auf 4 °C gekühlten Zentrifuge (Centrifuge 5804 R, Eppendorf AG, Hamburg) bei 10.000 Runden pro Min. (rpm) 15 Minuten lang. Proteinkonzentrationsbestimmung des Homogenisates mit dem Photometer (BioPhotometer, Eppendorf AG, Hamburg) mit der Bradford-Methode. Fortfahren mit dem Kit. In der Verdünnung von 19 zu 1 (Probe : Detergent) inkubierten die Proben 10 Min. auf Eis gefolgt von einem weiteren Zentrifugenschritt, wieder bei 4 °C allerdings 1000 rpm für 10 Min.. Mithilfe des im Kit mitgelieferten Puffers (20 x Buffer, Part/Lot# GR 153128-4) wurden die Proben so verdünnt, dass beim Pipettieren pro Well 60-70  $\mu\text{g}$  Protein aufgetragen wurden. Auf Eis wurden jeweils 200  $\mu\text{l}$  Probe in die Wells

pipettiert und dann drei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Von jeder Probe wurden 3 Wells befüllt, sodass von jeder Probe drei Messungen durchgeführt werden konnten. Vor der Messung durch den ELISA-Reader (Original Multiskan EX, Labsystems, Manufactured in Finland) wurde 1 x Stabilizer aus 5 x Stabilizer und Puffer gemischt und die „Assay Solution“ aus 20 x Reagent Mix, 1 x Puffer, 100 x Coupler und 100 x ReagentDye wie angegeben zusammenpipettiert. Die Wells wurden nach der Inkubationszeit geleert und in die Wells wurden jeweils 300 µl 1 x Stabilizer pipettiert. Danach werden die Wells direkt wieder geleert, noch einmal mit 300 µl 1 x Stabilizer befüllt und wieder geleert. Im nächsten Schritt wurden die Wells mit je 200 µl der Assay Solution befüllt. Luftblasen wurden mit Hilfe einer Kanüle zerstochen und das Well dann im ELISA-Reader bei 450 Nanometer (nm) im kinetischen Programm (GENESIS LITE, Version 2.16, Life Sciences, UK Ltd.) alle zehn Sekunden gemessen.



**Abbildung 8:** Schematische Darstellung der Reaktion des Pyruvatedehydrogenase Enzyme Activity Microplate Assay Kit in der Well-Platte. Die optische Dichte des leuchtenden Dye wird im ELISA-Reader gemessen [94].

### 2.3 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgt mit GraphPadPrism 4 Statistical Software (GraphPad, San Diego, California, USA). Für die parametrischen Daten des ICP, der LDF und der PDH-Aktivität wurde zum Vergleich der beiden Gruppen ein T-Test für unabhängige Stichproben verwendet. Ein p-Wert von  $< 0.05$  wurde als signifikant gewertet. Die Ergebnisse sind als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung angegeben. Für die Auswertung der unterschiedlichen Enzymaktivität zwischen SAB- und Kontroll-Tieren wurde eine Regressionsanalyse durchgeführt und der Vergleich der Aktivitäten des PDHC mittels Mann-Whitney-U-Test vorgenommen.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Operation der Ratten

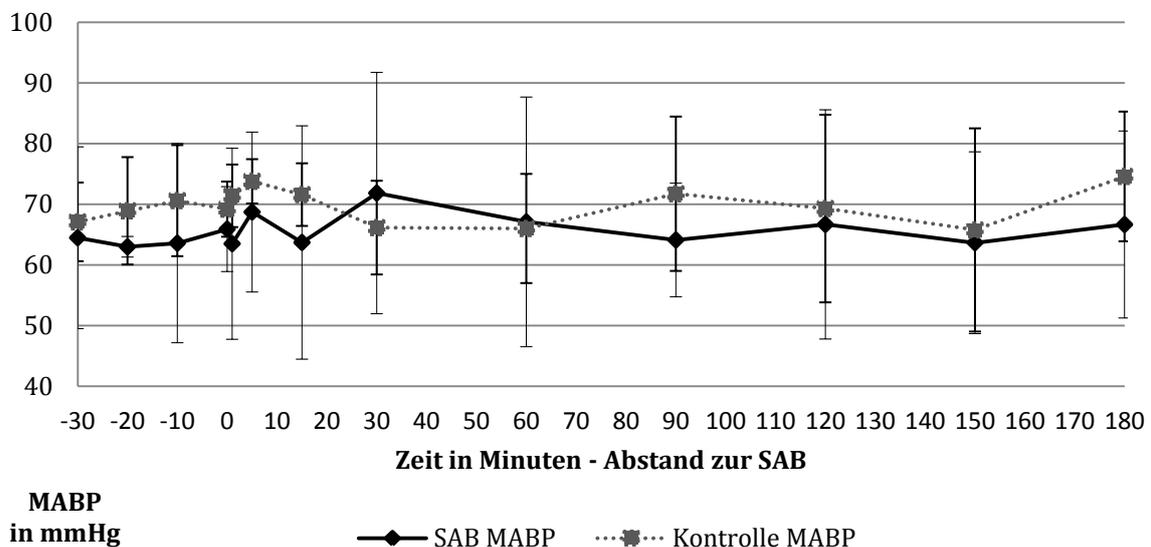
#### 3.1.1 Physiologische Parameter

PH-Wert, Körpertemperatur,  $p\text{CO}_2$ ,  $p\text{O}_2$  und Blutglukosekonzentration waren vor Auslösen der SAB innerhalb des Normbereiches. Als Normwerte für die arterielle Blutgasanalyse wurde ein pH von 7,36 – 7,44, ein  $p\text{CO}_2$  von 36 – 44 mmHg und  $p\text{O}_2$  von 90 – 140 mmHg toleriert. Bei Abweichung von pH,  $p\text{CO}_2$  oder  $p\text{O}_2$  vor Auslösen der SAB erfolgte eine Modifikation der mechanischen Ventilation bis die Normwerte erreicht waren. Diese decken sich mit vorangegangenen Ergebnissen unserer Arbeitsgruppe [48]. Auf die Darstellung der Werte wird an dieser Stelle verzichtet.

#### 3.1.2 Intraarterielle Blutdruckmessung

Während der Zeit des Monitorings von ca. 3,5 Stunden wurde der arterielle Mitteldruck (mean arterial blood pressure, MABP) der Ratten kontinuierlich intraarteriell in der kanülierten Schwanzarterie der Tiere gemessen. Im Durchschnitt lag der MABP innerhalb der letzten halben Stunde vor der SAB-Induktion bei  $64,3 \text{ mmHg} \pm 12,1$

mmHg. Im Vergleich dazu lagen die Werte bei Kontroll-Tieren innerhalb des gleichen Zeitraumes ab OP-Beginn bei  $69 \pm 7,3$  mmHg. Dieser Unterschied war nicht signifikant. Fünf Minuten nach Auslösen der SAB kam es bei SAB-Tieren zu einer Steigerung des MABP auf einen Druck von im Durchschnitt  $68,7 \pm 15,1$  mmHg. Eine Stunde nach SAB lagen die MABP-Werte im Durchschnitt bei  $67,1 \pm 10$  mmHg und nach drei Stunden bei  $66,6 \pm 5,7$  mmHg. Der durchschnittliche Wert des MABP betrug bei Kontroll-Tieren  $69,7 \pm 8,9$  mmHg. Bei ihnen lag der MABP nach 35 Minuten OP-Dauer (fünf Minuten nach Auslösen der SAB bei den SAB-Tieren) im Durchschnitt bei  $73,8 \pm 3,6$  mmHg. Nach 1,5 Stunden OP-Dauer (eine Stunde nach Auslösen der SAB bei den SAB-Tieren) lag der MABP im Durchschnitt bei  $66,0 \pm 9,0$  mmHg. Nach 3,5 Stunden OP-Dauer (drei Stunden nach Auslösen der SAB bei den SAB-Tieren) bestand bei den Kontroll-Tieren ein durchschnittlicher MABP von  $74,6 \pm 10,7$  mmHg.

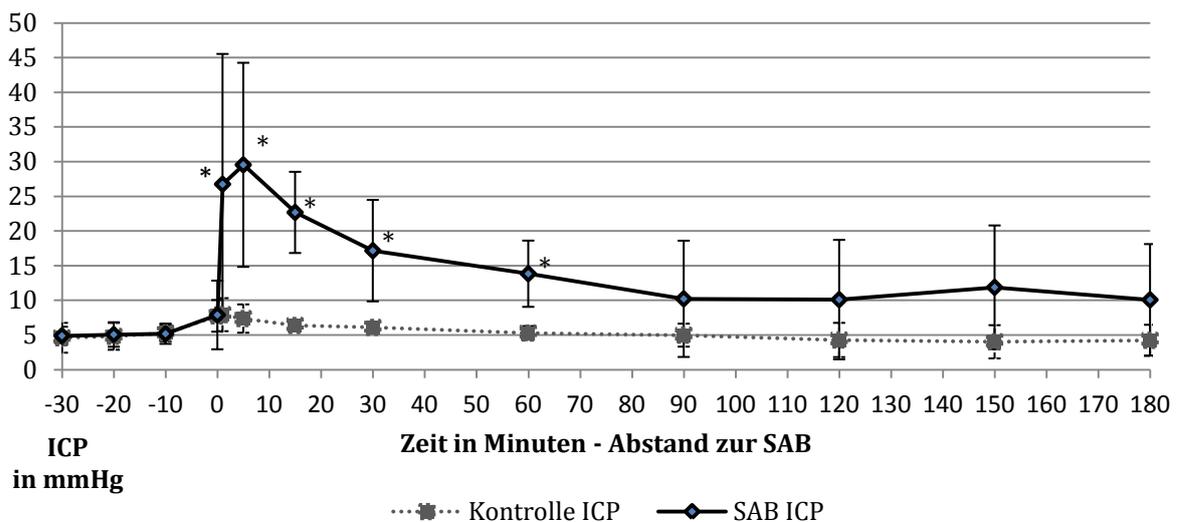


**Abbildung 9:** Arterieller Mitteldruck (MABP) in mmHg (y-Achse): Intraarterielle Messung während des Operationsverlaufs 30 Minuten vor und bis 180 Minuten (x-Achse) nach der SAB; Im Vergleich SAB-Tiere (n=9) vs. Kontroll-Tiere (n=9).

Die Abbildung 9 zeigt einen konstanten MABP vor dem Auslösen der SAB und den darauffolgenden Anstieg vor allem innerhalb der ersten fünf Minuten nach Auslösen der SAB. Im weiteren Verlauf bestehen Schwankungen. 120 Minuten nach der SAB hat sich der MABP wieder in seinem Ausgangsniveau eingependelt. Im Vergleich dazu liegen bei den Kontroll-Tieren ebenfalls deutliche Schwankungen des MABP vor, allerdings ohne signifikante Veränderungen.

### 3.1.3 Messung des intrakraniellen Drucks (ICP)

Die innerhalb der Monitoringzeit kontinuierlich durchgeführte Messung des ICP der Ratten ergab in der letzten halben Stunde vor Induktion der SAB durchschnittliche Werte von  $5,1 \pm 1,5$  mmHg. Eine Minute nach Auslösen der SAB stieg der durchschnittliche intrakranielle Druck signifikant auf  $26,7 \pm 18,8$  mmHg und fünf Minuten nach der SAB auf durchschnittlich  $29,5 \pm 14,7$  mmHg an. Im Gegensatz dazu bestand bei den Kontrolltieren nach 31 Minuten OP-Dauer (eine Minute nach Auslösen der SAB bei SAB-Tieren) ein durchschnittlicher ICP von  $8,0 \pm 2,4$  mmHg, dieser Wert änderte sich auf im Durchschnitt  $7,4 \pm 2,0$  mmHg nach 35 Minuten OP-Dauer (fünf Minuten nach Auslösen der SAB bei SAB-Tieren). Eine Stunde nach der SAB-Induktion hatte sich der ICP dem Ausgangswert wieder angenähert und lag im Durchschnitt bei den SAB-Tieren bei  $13,8 \pm 4,8$  mmHg. Bei den Kontroll-Tieren bestand nach 1,5 Stunden OP-Dauer (eine Stunde nach Auslösen der SAB bei SAB-Tieren) ein durchschnittlicher ICP von  $5,3 \pm 1,0$  mmHg.



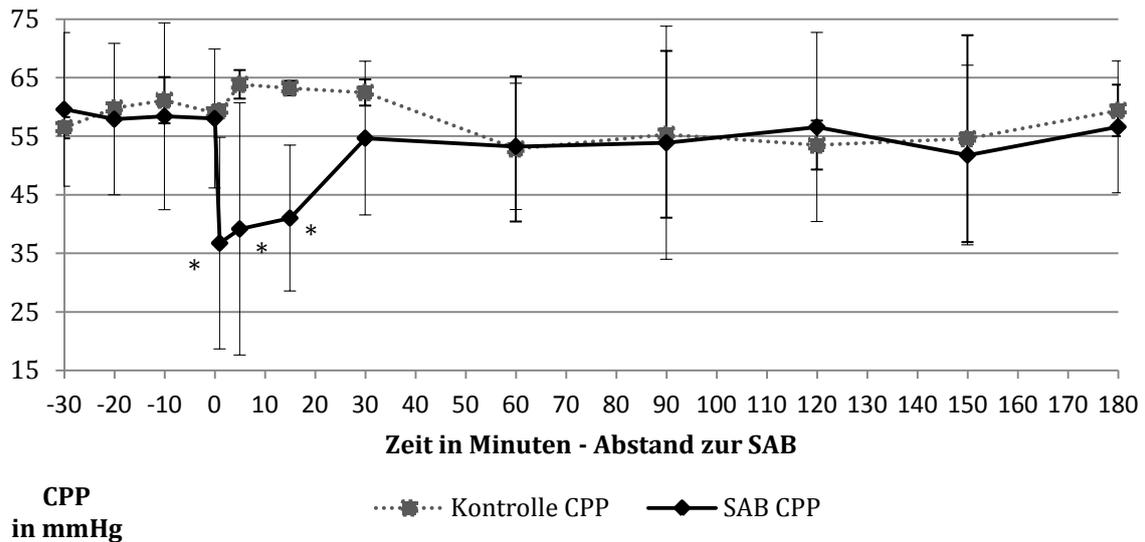
**Abbildung 10:** Intrakranieller Druck (ICP) in mmHg während des Operationsverlaufes 30 Minuten vor und bis 180 Minuten nach der SAB; Im Vergleich SAB-Tiere vs. Kontroll-Tiere (x-Achse: Zeit in Minuten; y-Achse: ICP); \*  $p < 0,05$  Kontroll-Tier (n=9) vs. SAB-Tier (n=9)

Die Abbildung 10 verdeutlicht den signifikanten Anstieg des ICP direkt nach der ausgelösten SAB bei den SAB-Tieren im Vergleich zu den Kontroll-Tieren bei Minute 1, 5, 15, 30 und 60 Minuten nach Auslösen der SAB ( $p < 0,05$ ).

### 3.1.4 Zerebraler Perfusionsdruck (CPP)

Der CPP wird aus dem MABP minus dem ICP berechnet [95]. Der CPP zeigte innerhalb der letzten halben Stunde vor SAB-Induktion einen durchschnittlichen Wert von  $58,6 \pm 14$  mmHg bei den SAB-Tieren und  $59,1 \pm 2,2$  mmHg bei den Kontroll-Tieren. Der CPP sank bei den SAB-Tieren eine Minute nach der SAB signifikant auf im Durchschnitt  $36,7 \pm 18,1$  mmHg, bei den Kontroll-Tieren bestand nach 31 Minuten OP-Dauer (eine Minute nach Auslösen der SAB bei den SAB-Tieren) ein durchschnittlicher CPP von  $59,3 \pm 0$  mmHg. Bei den SAB-Tieren stieg der CPP fünf Minuten nach der SAB bereits wieder auf  $39,2 \pm 21,5$  mmHg (Kontroll-Tiere:  $63,8 \pm 2,4$  mmHg), um nach einer halben Stunde

nach Auslösen der SAB wieder annähernd bei seinem Ausgangswert anzukommen, im Durchschnitt lag der CPP 30 Minuten nach SAB-Auslösung bereits wieder bei  $54,7 \pm 13,1$  mmHg (Kontroll-Tiere:  $62,5 \pm 2,2$  mmHg).



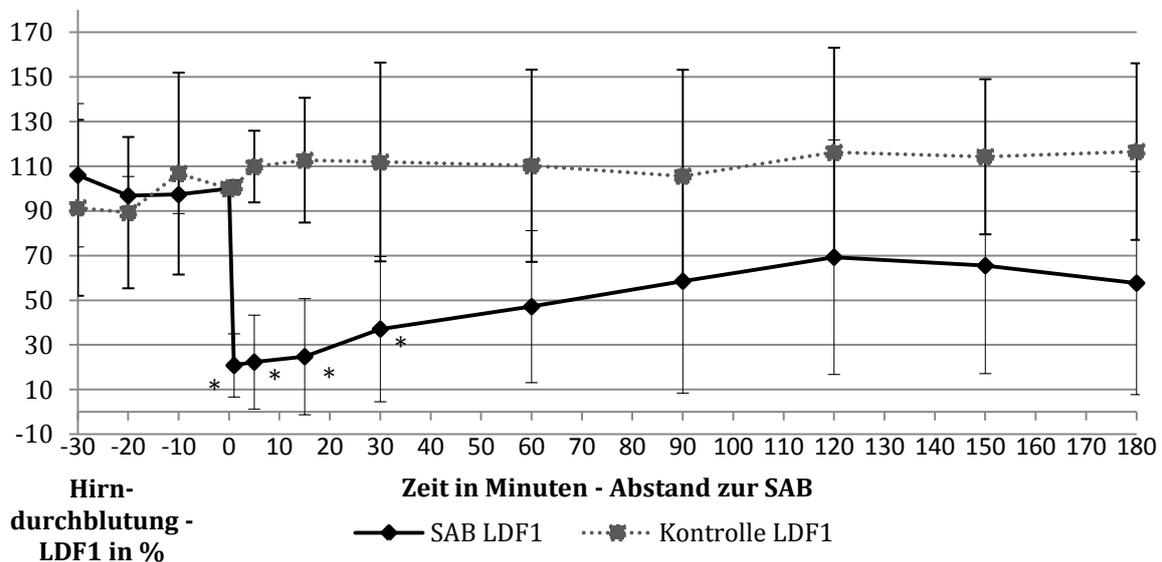
**Abbildung 11:** Zerebraler Perfusionsdruck (CPP) in mmHg während des Operationsverlaufes 30 Minuten vor und bis 180 Minuten nach der SAB; Im Vergleich SAB-Tiere vs. Kontroll-Tiere (x-Achse: Zeit in Minuten; y-Achse: CPP); \*  $p < 0,05$  Kontroll-Tier (n=9) vs. SAB-Tier (n=9)

Die Abbildung 11 zeigt den signifikanten Unterschied zwischen SAB-Tieren und Kontroll-Tieren (1, 5 und 15 Minuten nach SAB). Im Durchschnitt lag der CPP bei Kontroll-Tieren bei  $59,3 \pm 5,0$  mmHg mit Werten zwischen 42,1 mmHg und 83,2 mmHg.

### 3.1.5 Messung der Hirndurchblutung (CBF)

Die Messung der Hirndurchblutung mittels Laser-Doppler-Sonden (Laser Doppler Flow - LDF) zeigte vor SAB-Induktion über der rechten Hemisphäre (LDF-1), also ipsilateral der SAB, einen durchschnittlichen Wert von 110 %. Eine Minute nach Auslösen der SAB fiel die Durchblutung auf  $22 \pm 12$  % des Ausgangswertes ab, nach fünf Minuten lag die

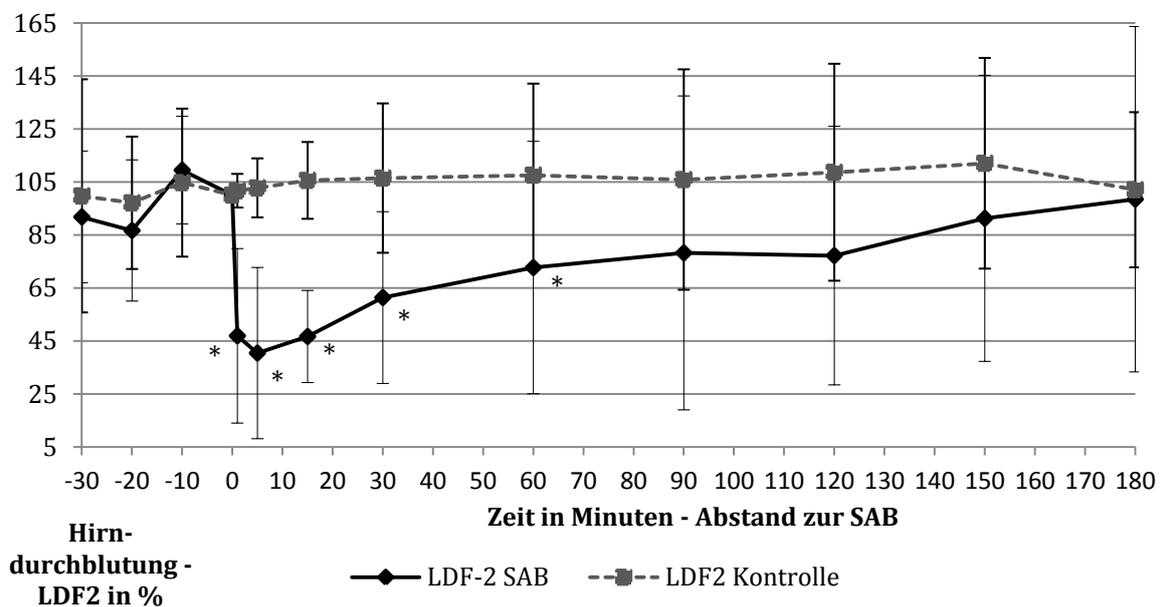
Durchblutung weiterhin bei  $22 \pm 21$  % des Ausgangswertes. Bei den Kontroll-Tieren bestand nach 31 Minuten OP-Dauer (eine Minute nach Auslösen der SAB bei den SAB-Tieren) ein LDF von  $101 \pm 3$  % des Ausgangswertes, nach 35 Minuten OP-Dauer von  $110 \pm 16$  %. Danach stieg die Durchblutung bei den SAB-Tieren wieder an, nach 30 Minuten waren wieder  $37 \pm 32$  % des Ausgangswertes erreicht (Kontroll-Tiere nach einer Stunde:  $112 \pm 45$  %). Der Ausgangswert der Hirndurchblutung wurde bei den SAB-Tieren innerhalb des Messverlaufes bis 180 Minuten nach Auslösen der SAB nicht mehr erreicht.



**Abbildung 12:** Hirndurchblutung (LCBF) der rechten Hemisphäre (y-Achse: LDF1 in % des Wertes bei 0 Minuten, x-Achse: Zeit in Minuten); \*  $p < 0,05$  Kontroll-Tier (n=9) vs. SAB-Tier (n=9)

In Abbildung 12 wird der Unterschied der Hirndurchblutung zwischen Tieren bei denen eine SAB ausgelöst wurde und den Kontroll-Tieren bereits innerhalb der ersten Minute nach der SAB mit signifikanten Unterschieden bei 1, 5, 15 und 30 Minuten nach der SAB deutlich.

Über der linken Hemisphäre (kontralateral der SAB) wurde vor Auslösen der SAB eine durchschnittliche Hirndurchblutung von 115,52 ml/100g/Min gemessen ( $96 \pm 24$  % des Ausgangswertes zum Zeitpunkt 0). Eine Minute nach der SAB-Auslösung fiel der Wert auf  $47 \pm 33$  % des Ausgangswertes ab; fünf Minuten nach der SAB auf  $41 \pm 32$  % des Ausgangswertes. Im Gegensatz dazu lag die durchschnittliche Hirndurchblutung bei den Kontroll-Tieren bei 245,1 ml/100g/Min und lag nach 31 Minuten OP-Dauer bei  $102 \pm 6$  % und nach 35 Minuten OP-Dauer bei  $103 \pm 11$  % (eine Minute und fünf Minuten nach Auslösen der SAB bei den SAB-Tieren). 150 Minuten nach der SAB lag der Wert wieder bei  $91 \pm 54$  % des Ausgangswertes und damit wieder im Rahmen der Schwankungen vor Induktion der SAB. Bei den Kontroll-Tieren bestand nach drei Stunden OP-Dauer (150 Minuten nach Auslösen der SAB bei den SAB-Tieren) ein durchschnittlicher Wert von  $112 \pm 40$  %. Die durchschnittlichen Werte bei den Kontroll-Tieren lagen insgesamt zwischen 97 und  $112 \pm 26,4$  % des Ausgangswertes.

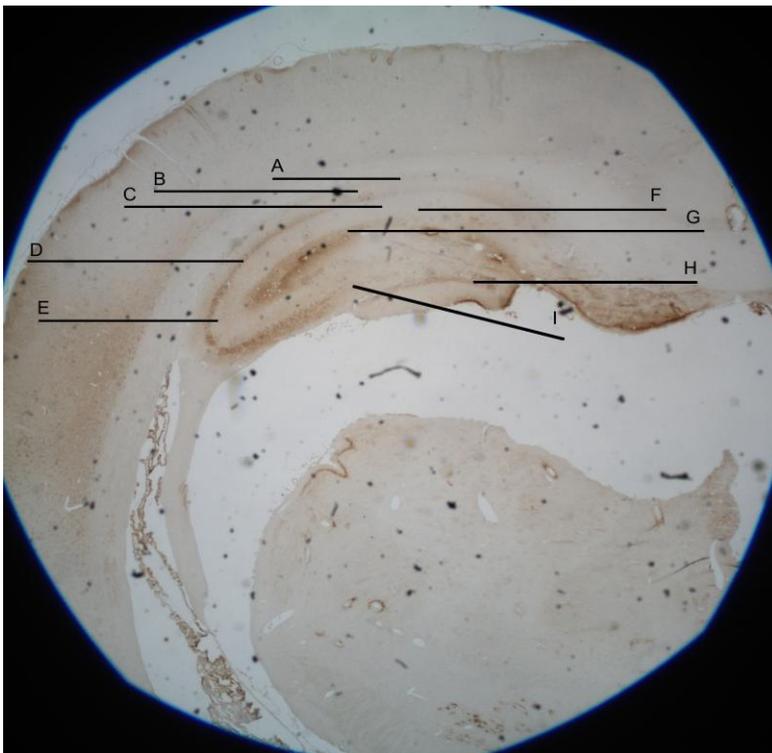


**Abbildung 13:** Hirndurchblutung (LCBF) der linken Hemisphäre (y-Achse: LDF2 in % des Ausgangswertes, x-Achse: Zeit in Minuten); \*  $p < 0,05$  Kontroll-Tier (n=9) vs. SAB-Tier (n=9)

Die Abbildung 13 zeigt die durch Laserdoppler gemessene Durchblutung der linken Hemisphäre (kontralateral der SAB) mit signifikanten Unterschieden zwischen SAB- und Kontroll-Tieren ( $p < 0,05$ ) nach 1, 5, 15, 30 und 60 Minuten nach Auslösen der SAB.

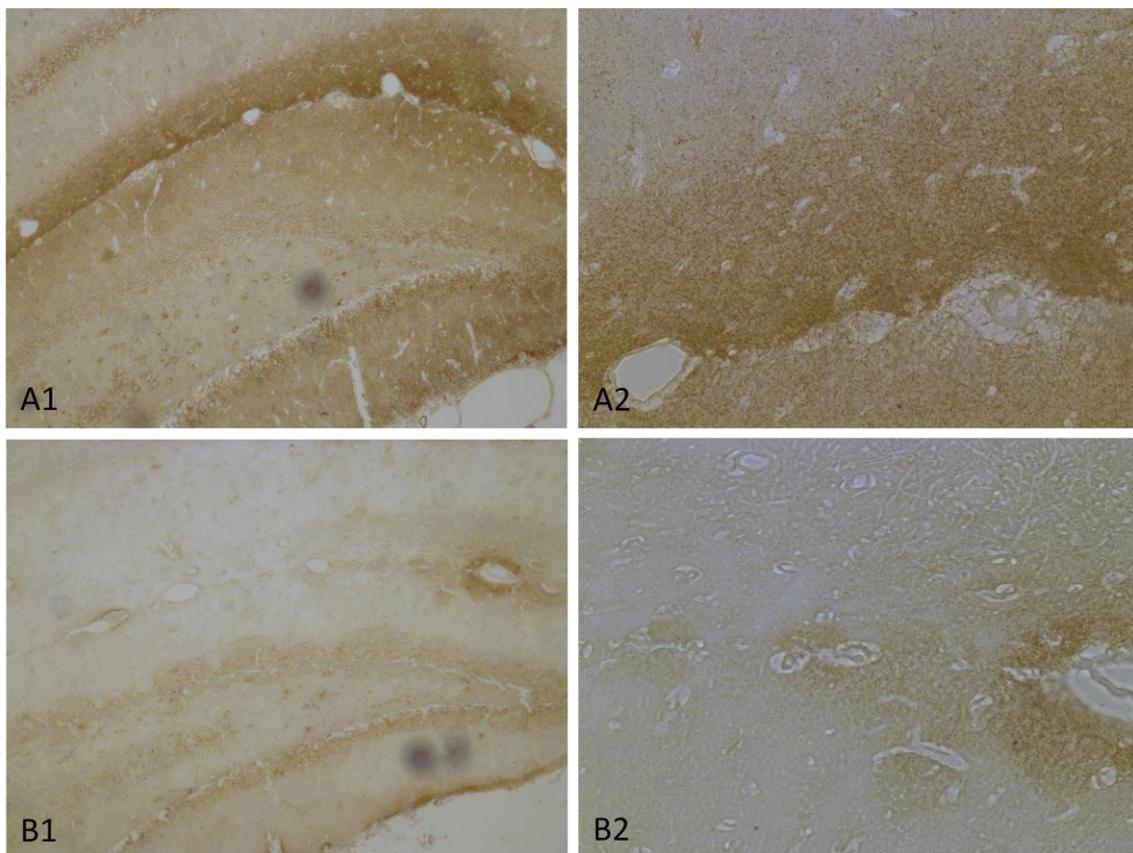
### 3.2 Immunhistochemische Färbung

Die semiquantitative Auswertung der immunhistochemischen Färbungen zeigte, dass sich der PDHC immunhistochemisch im Hirngewebe der Ratten darstellen ließ. Exemplarisch ist in Abbildung 14 ein mittels 2,5er Objektiv vergrößerter mikrotomographisch angefertigter Rattengehirnschnitt beschriftet.



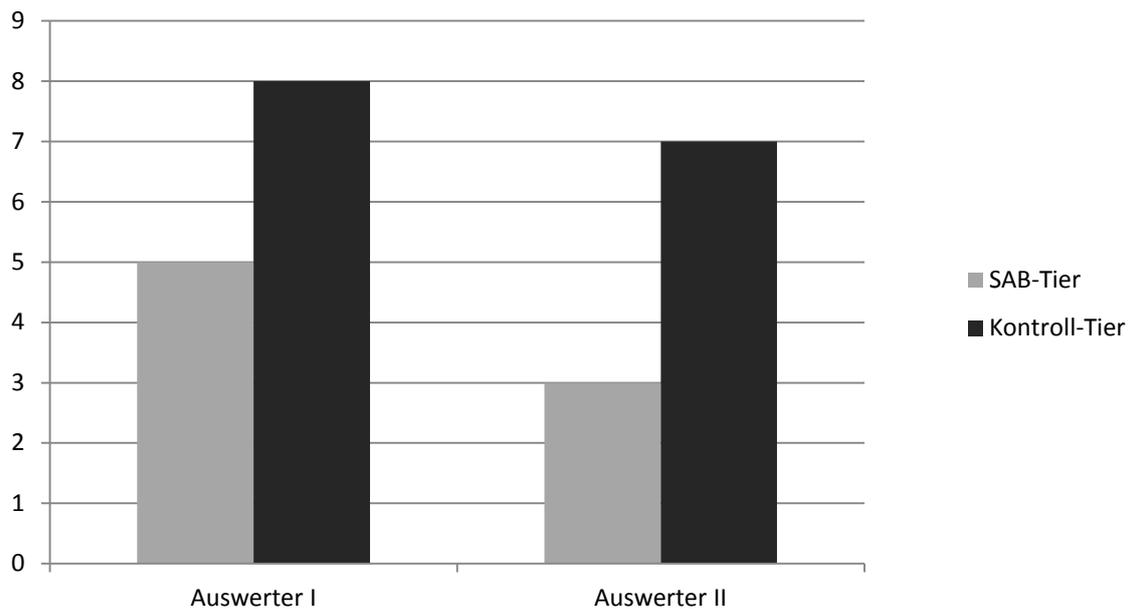
**Abbildung 14:** Vorderer Hippocampus A: Alveus; B Stratum oriens; C: CA 1; D: CA 2; E:Stratum lucidum; F: Stratum radiatum; G: Lamnoscum moleculare; H: Stratum granulosum des Gyrus dentatus; I CA 3 [96]. Bei dem beschrifteten Areal handelt es sich um den vorderen Hippocampusanteil mit seinen unterschiedlichen anatomischen und funktionellen Bereichen.

In der folgenden Abbildung 15 sind im Vergleich Kontroll-Tier zu SAB-Tier jeweils in zwei Vergrößerungen dargestellt. In der ersten Reihe ist exemplarisch ein Kontroll-Tier zu sehen. Es findet sich linksseitig eine 100er Vergrößerung (A1) und rechtsseitig eine 400er Vergrößerung (B2). In der Reihe darunter ist exemplarisch ein SAB-Tier zu sehen. Linksseitig in 100er Vergrößerung (B1) und rechtsseitig in 400er Vergrößerung (B2). Das braune Signal zeigt den mittels des Chromogens DAB sichtbargemachten Primärantikörper gegen PDHC.



**Abbildung 15:** PDHC Immunhistochemie histologische Bilder exemplarisch; Hippocampus Bereich CA1 mit bandförmiger Positivität in Kontroll-Tier (obere Reihe: A) und SAB-Tier (untere Reihe: B) A1 Kontroll-Tier 100er Vergrößerung; A2 Kontroll-Tier 400er Vergrößerung; B1 SAB-Tier 100er Vergrößerung; B2 SAB-Tier 400er Vergrößerung

Insgesamt zeigte sich in der Auswertung den von zwei unabhängigen Auswertern (I, II) semiquantitativ bewerteten immunhistochemischen Färbungen mit dem PDHC-Antikörper in den Kontroll-Tier-Gehirnen eine stärkere Positivität (mäßiggradige (2) bis starke (3) Positivität) mit einem durchschnittlichen Score von 2,7 (I) bzw. 2,3 (II) pro Tier. In den SAB-Tieren fand sich eine schwache (1) bis mäßiggradige (2) Positivität mit einem durchschnittlichen Score von 1,7 (I) bzw. 1 (II) pro Tier. Die Abbildung 16 zeigt den Summenscore der drei SAB- bzw. Kontroll-Tiere von Auswerter I und II im Vergleich. Bei Auswerter I ergab sich durch Addition der jeweiligen Intensität (1 x schwach und 2 x mäßiggradig) ein Summenscore von 5 bei den SAB-Tieren mit durchschnittlichem Score von 1,7 pro Tier, bei Auswerter II durch Addition der jeweiligen Intensität (3 x schwach) ein Summenscore von 3 mit durchschnittlichem Score 1 pro Tier. Bei den Kontroll-Tieren ergab sich bei Auswerter I durch Addition der jeweiligen Intensität (1 x mäßiggradig und 2 x stark) ein Summenscore von 8 mit durchschnittlichem Score 2,7 pro Kontroll-Tier und bei Auswerter II durch Addition der jeweiligen Intensität (2 x mäßiggradig und 1 x stark) ein Summenscore von 7 mit durchschnittlichem Score von 2,3 pro Kontroll-Tier. Anhand der Auswertung ist ein klarer Trend der beiden unabhängigen und verblindeten Auswerter zu sehen. Die SAB-Tiere zeigten eine deutlich schwächere Positivität der PDHC Färbung als die Kontroll-Tiere. Einschränkend muss aber auf die geringe Anzahl der auswertbaren Rattengehirne verwiesen werden, zu der es im Rahmen der Gewebeprozessierung durch Materialverlust kam. Abschließend standen somit nur drei Kontroll- und drei SAB-Tiere bezüglich der PDHC Immunhistochemie zur Auswertung zur Verfügung, auf eine statistische Auswertung wurde daher verzichtet.

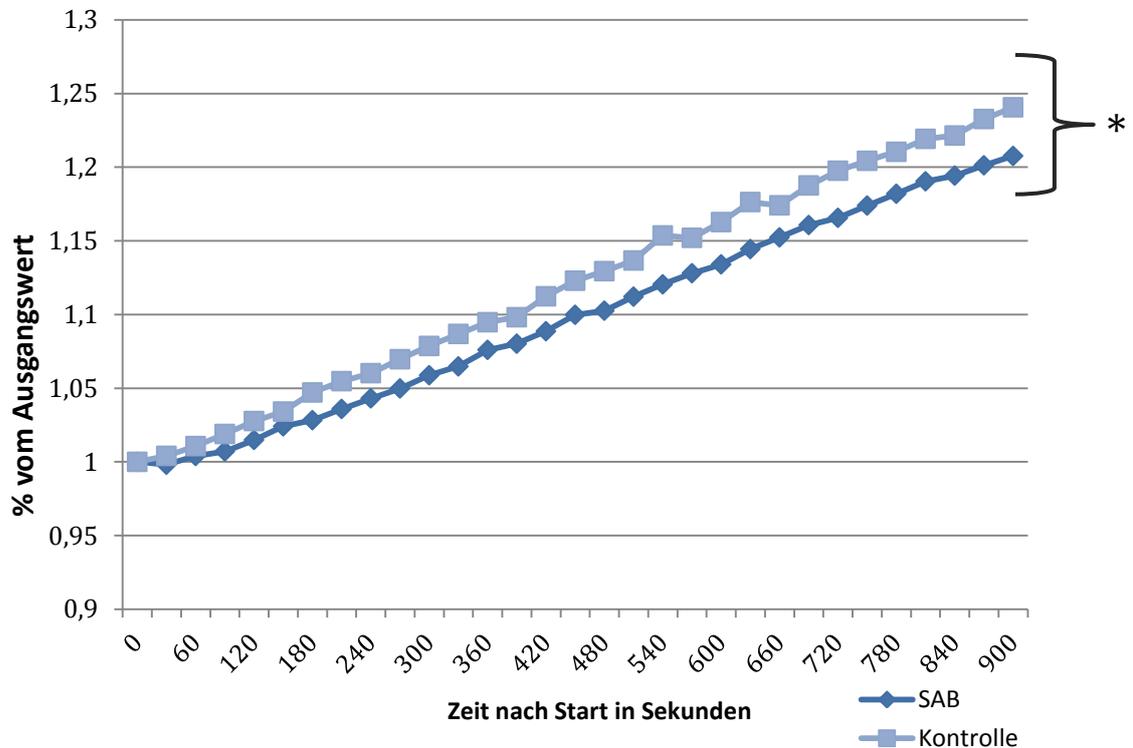


**Abbildung 16:** PDHC Immunhistochemie Auswertung: Im Vergleich SAB- und Kontroll-Tiere; jeweils Summenscore der Tiere im Vergleich Auswerter I und II; SAB-Tiere (n=3), Kontroll-Tiere (n=3)

### 3.3 Messung der Aktivität des PDHC

Die Messung der optischen Dichte durch den ELISA-Reader ergab signifikante Einbußen der PDHC-Aktivität in SAB-Tieren im Vergleich zu Kontroll-Tieren. Die Werte zeigten, dass die optische Dichte während des Messverlaufes in beiden Gruppen stetig zunahm, es bestand aber ein Unterschied zwischen SAB- und Kontroll-Tieren. Die steigende optische Dichte zeigte eine Zunahme des ReagentDye an, welches bei PDHC-Aktivität gebildet wird. Die durchweg geringere optische Dichte im Hirngewebe bei SAB-Tieren zeigte, dass innerhalb des Hirngewebes dieser Tiere nach einer SAB weniger ReagentDye durch den PDHC umgesetzt wurde, die optische Dichte somit geringer war. Bei Kontroll-Tieren war die Menge des entstehenden ReagentDye größer, sodass hier von einer stärkeren Aktivität des Enzymkomplexes ausgegangen werden muss.

## Optische Dichte



**Abbildung 17:** Messung der PDHC-Aktivität via ELISA-Reader, dargestellt in % des Ausgangswertes (y-Achse). Kinetische Messung bei 450 nm alle 10 Sekunden über einen Zeitraum von 15 Minuten. \* =  $p < 0,01$ ; Kontroll-Tiere (n=9) SAB-Tiere (n=9) [97]

In Abbildung 17 ist der Verlauf der Steigung der optischen Dichte und damit indirekt die PDHC-Aktivität zu sehen sowie auch der im Verlauf zunehmende Unterschied zwischen SAB- und Kontroll-Tieren. Es zeigte sich in der Rangfolge der Werte ein Unterschied zwischen der PDHC-Aktivität in SAB- und Kontroll-Tieren. Ein signifikanter Unterschied zwischen SAB- und Kontrolltieren bestand in der gesamten Rangfolge ( $U_1 = 410$ ;  $U_2 = 162$ ;  $|z| = 123,629$ ;  $p < 0,01$ ).

## 4 Diskussion

### 4.1 MABP, ICP, CPP, CBF

Die Ergebnisse der Ratten-Operationen zeigen, dass die gemessenen Werte vor SAB-Induktion innerhalb der Normbereiche der physiologischen Parameter lagen. Nach der SAB-Induktion kam es zu einem Anstieg des MABP. Der Hirndruck der Ratten veränderte sich nach Induktion der SAB rasch. Es kam zum signifikanten Anstieg unmittelbar nach Auslösen der Blutung. Diese Beobachtungen stimmen mit experimentell an Katzen gewonnenen Ergebnissen von Trojanowski et al. aus dem Jahre 1984 [98], aber auch mit früheren Versuchen unserer eigenen Arbeitsgruppe, überein [99]. Des Weiteren war ein signifikanter Abfall der Hirndurchblutung nach der SAB festzustellen. Dieser war in den ersten Minuten nach SAB auf den Anstieg des ICP und konsekutiven Abfall des CPP zurückzuführen. Diese Tatsache deckt sich mit früheren Untersuchungen von Grubb et al. und Westermaier et al. [47, 49]. Der Abfall des CPP erholte sich jedoch nach kurzer Zeit wieder und es bestand eine Diskrepanz zwischen dem CPP und der eigentlichen Hirndurchblutung. Diese ist am ehesten zurückzuführen auf eine akute Gefäßreaktion, die bereits wenige Sekunden bis Minuten nach der SAB auftritt und mehrere Stunden oder möglicherweise sogar Tage nach der SAB anhält [38, 100].

### 4.2 Immunhistochemische Färbung

Die semiquantitative Auswertung der histologischen Schnitte durch zwei verblindete unabhängige Auswerter zeigte eine verminderte Färbeintensität der Zellen des Hirngewebes der SAB-Tiere; dies konnte in einem klaren Trend bei beiden Auswertern verzeichnet werden. Allerdings wurde aufgrund der geringen Anzahl der zur Auswertung zur Verfügung stehenden immunhistochemischen Färbungen (jeweils drei Kontroll- bzw. SAB-Tiere) auf eine statistische Auswertung verzichtet. Für eine stabile statistische Aussagekraft wäre eine Erhöhung der Probenanzahl notwendig, die durch eine Wiederholung der Färbungen an weiteren Versuchstieren erzielt werden könnte.

Die Positivität der histologischen Schnitte der Rattengehirne für den monoklonalen Antikörper gegen den PDHC bewies das Vorliegen des PDHC im Rattengehirn. Es bestand damit die Voraussetzung für weitere Untersuchungen zur PDHC-Aktivitätsbestimmung. Da der Antikörper an den PDHC bindet und ihn somit darstellt, könnte aus den oben genannten Ergebnissen der immunhistochemischen Färbung geschlossen werden, dass nach der SAB eine erniedrigte Konzentration des PDHC vorliegt. Eine weitere Ursache für die schwächere Färbung könnte auch eine veränderte PDHC-Struktur oder ein -Schaden sein, die oder der die Bindung des Antikörpers nicht mehr erlaubt. Richards et al. zeigten 2006 im Herzstillstand-Modell an Hunden, dass oxidativer Stress zu Einbußen der hippocampalen PDHC Aktivität während zerebraler Ischämie führt [101]. Bogaert et al. konnten zeigen, dass es nach globaler Ischämie und Reperfusion (Herzstillstand-Modell) zu einer Abnahme der Färbeintensität des Antikörpers gegen den PDHC vor allem in den Pyramidalzellen (Schicht V) kommt [102]. Das immunhistochemische Expressionsmuster des PDHC wurde beispielsweise auch im Magenkarzinom untersucht, hierbei zeigte sich ein signifikant besseres Überleben der Patienten mit einer PDHC Expression im Tumor [103].

#### 4.3 PDHC-Aktivität

In der hier vorliegenden Versuchsreihe konnte erstmals eine deutliche Einschränkung der PDHC-Aktivität im Rattenhirn nach Induktion einer experimentellen SAB nachgewiesen werden, wie wir mit diesen Daten bereits 2017 publizieren konnten [97]. Diese Beobachtungen sind bislang, weder im tierexperimentellen Modell noch beim Menschen beschrieben und könnten auf eine Störung des oxidativen Stoffwechsels in den ersten Stunden nach SAB hindeuten. Gestützt wird diese Hypothese durch frühere Studien der eigenen Arbeitsgruppe, in denen innerhalb der ersten 6 Stunden nach experimenteller SAB signifikante Anstiege der Glutamat- und Laktat-Konzentrationen im Vergleich zu Kontroll-Tieren gezeigt werden konnten, einhergehend mit einer persistierend erhöhten Pyruvatkonzentration in SAB-Tieren und signifikant erhöhter L/P-Ratio in SAB-Tieren gegenüber Kontroll-Tieren [48, 49]. Für denselben Zeitraum konnte

– nach vorübergehendem Abfall der Sauerstoffkonzentration im Hirngewebe unmittelbar nach der SAB - eine zunehmende Erholung derselben gezeigt werden, die nach 6 Stunden in einen Überschuss des Gewebe-Sauerstoffs mündete [48]. Diese Konstellation weist auf einen Defekt im oxidativen Stoffwechsel des Gehirns hin und war Anlass für die weiterführenden Untersuchungen, die ersten Stunden nach einer SAB betreffend, die im Rahmen dieser Promotionsarbeit durchgeführt wurden. Als Schlüsselenzym für das Einschleusen von Pyruvat in den oxidativen Stoffwechsel war die Untersuchung der Aktivität des PDHC nach SAB angezeigt.

#### 4.3.1 PDHC

Der PDHC ist das Schlüsselenzym zwischen anaerober und aerober Glykolyse, dadurch, dass er Pyruvat in den Zitratzyklus einschleust [50]. Aktiv ist der Komplex, wenn er dephosphoryliert vorliegt [63], die Aktivität wird durch einen hohen intrazellulären Calciumspiegel und eine hohe Magnesium- und Sauerstoffkonzentration im Zytosol gesteigert. Eine hohe Konzentration dieser Stoffe begünstigt somit eine aerobe Energiegewinnung mit Hilfe des aktivierten PDHC [62]. Über eine Hemmung der PDK, die den Komplex phosphorylieren und damit inaktivieren, durch ADP und auch durch  $\text{Ca}^{2+}$ , kann es zu einer Aktivitätssteigerung des PDHC kommen [62]. Eine Hemmung des PDHC wird durch die PDK1-4 herbeigeführt. PDK werden durch eine hohe Konzentration an Acetyl-CoA und  $\text{NADH}+\text{H}^+$  aktiviert. Die Konzentration von Acetyl-CoA und  $\text{NADH}+\text{H}^+$  nimmt bei steigender aeroben Energiegewinnung zu, wobei das Vorhandensein beider Substanzen einen additiven Effekt aufweist [68]. Verschiedene Studien wurden zur zerebralen Ischämie und traumatischen Hirnverletzung bezüglich der PDHC-Funktion und -Aktivität veröffentlicht. Zaidan und Sims zeigten nach 30-minütiger experimenteller Frontalhirnischämie an Ratten eine Reduktion der Aktivität des PDHC innerhalb vulnerabler Neurone des dorsolateralen Striatums [104]. Beobachtungen von Bogaert et al. bestätigten diese Ergebnisse. Sie zeigten eine 72-%ige Reduktion der PDHC-Aktivität nach Ischämie und 30-minütiger Reperfusion und stellten die reduzierte PDHC-Aktivität als mögliche Ursache für neuronalen Zelltod heraus

[105]. Da keine Änderung der PDHC-Aktivität nach alleiniger Ischämiephase ohne Reperfusion beobachtet wurde, postulierten die Autoren die Aktivitätsabnahme als Reperusionsfolge und nicht als direkte Ischämiefolge [105]. Im Vergleich zur Ischämie liegen bei der SAB andere Veränderungen des CPP und der LCBF vor. Im tierexperimentellen Modell an der Ratte nimmt der CPP nach Auslösen der SAB signifikant ab, erholt sich aber schnell und ist nach ungefähr 30 Minuten wieder annähernd auf dem Ausgangsniveau angelangt. Die Hirndurchblutung nach SAB fällt ebenfalls direkt nach Auslösen ab, erholt sich aber langsamer und liegt drei Stunden nach der SAB noch unterhalb des Ausgangswertes. Diese Veränderungen lassen im Gegensatz zur globalen Ischämie nicht an eine komplette, zeitlich begrenzte Ischämie, sondern an einen länger andauernden „low-flow“ Status innerhalb der ersten Stunden nach SAB denken [106, 107]. Auch eine postischämische Hyperperfusion findet nicht statt.

Es ist möglich, dass der andauernd erniedrigte LCBF nach SAB zu einer länger andauernden Störung des oxidativen Stoffwechsels führt, sodass die Neurone die aerobe Energiegewinnung in den anaeroben Stoffwechsel verlagern müssen [108]. Dieser Wechsel von einer aeroben zu einer anaeroben Energiegewinnung durch eine Funktionsstörung bzw. einen Verbrauch an PDHC könnte die gleichzeitige Erhöhung der Laktat- und Pyruvatkonzentration erklären, die in vorangegangenen Studien beobachtet werden konnte [49]. Weiterhin könnte eine Störung der PDHC-Aktivität auch durch das durch die Blutung und zugrunde gehende Erythrozyten freigesetzte Hämoglobin zustande kommen, welches direkt toxisch auf die Neurone wirkt. In tierexperimentellen Versuchen der Katze zur Auswirkung von Hämoglobin auf das Zentralnervensystem, konnten Sadrafzadeh et al. zeigen, dass freigesetztes Hämoglobin durch ionenabhängige Mechanismen zur Gewebeschädigung führt [109]. Eine Eindämmung des Schadens erreichten sie durch die Gabe des Ionen-Chelatbildner Deferoxamin [109]. Wang et al. konnten weiterhin in Zellversuchen zeigen, dass Hämoglobin eine dosis- und zeitabhängige Neurotoxizität gegenüber primär kortikaler Neurone aufweist; für diesen Effekt waren nicht nur Caspase-Kaskaden verantwortlich, sondern auch parallele Wege des oxidativen Stresses [110]. Es könnte also eventuell auch eine Beeinflussung der PDHC-Aktivität durch Hämoglobin vorliegen.

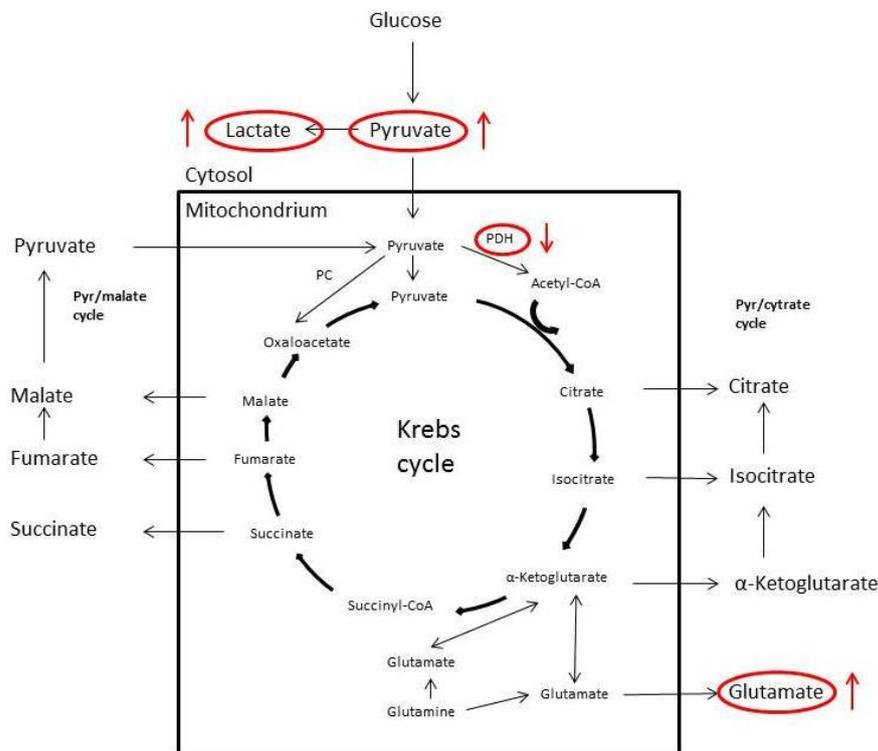
Demgegenüber ist es unwahrscheinlich, dass der Abfall der PDHC-Aktivität in den in dieser Arbeit vorliegenden Versuchen von Kofaktoren abhängig ist, da in der Testlösung (Assay solution) des verwendeten Kits eine ausreichende Menge an Kofaktoren vorhanden ist. Zaidan und Sims kamen 1993 in ihren Versuchsmodellen bezüglich Ischämie und Reperfusion zu dem Ergebnis, dass die Veränderungen in der mitochondrialen Atmungskette im dorsolateralen Striatum von der Aktivitätsabnahme des PDHC abhängig sind [111]. So sank nach dreistündiger Reperfusion in den isolierten Mitochondrien die Aktivität des PDHC auf 68 % der Kontrollwerte [111]. Sie beobachteten keine signifikanten Änderungen in zwei weiteren mitochondrialen Markern. Die PDHC-Aktivitätsabnahme führten sie eher auf einen Verlust des Enzymkomplexes oder eine Inaktivierung als auf die klassische Hemmung durch Phosphorylierung zurück [111]. Als möglichen Auslöser nennen Zaidan und Sims einen intramitochondrial erhöhten Calciumspiegel [111]. Dies unterstützt die vorliegenden Ergebnisse, da in dem verwendeten Kit ausreichende Mengen der Kofaktoren vorhanden sind. Weiterhin gibt es Studien, beispielsweise von Bogaert et al., die oxidativen Stress für den reperfusionsabhängigen Abfall der cerebralen PDHC-Aktivität verantwortlich machen [105]. Im Rahmen der Reperfusion kommt es zu oxidativem Stress [112] und somit treten erhöhte Spiegel für Superoxide, Hydroxylradikale, Nitritoxide und Peroxynitrite auf, was besonders im Zentralnervensystem bei den hier befindlichen sehr vulnerablen Zellen, von großer Bedeutung ist [113]. Vereczki et al. untersuchten die Auswirkungen unterschiedlicher Sauerstoffkonzentrationen innerhalb der Beatmungsluft nach Herzstillstand. Sie kamen zu dem Ergebnis, dass eine 21 %ige Sauerstoffkonzentration in der Beatmungsluft vor einer lebensgefährlichen Reduktion der PDHC-Aktivität, wie sie bei einer 100 %igen Sauerstoffkonzentration in der Beatmungsluft auftritt, schützt. Die 100 %ige Sauerstoffkonzentration führte nach zwei stündiger Reperfusion zu einer signifikanten Abnahme der immunhistochemischen Anfärbbarkeit von Nitrotyrosin, einem Produkt des PDHC. Es wurde hingegen keine signifikante Abnahme bei einer Beatmung mit 21 %igem Sauerstoff im Vergleich zu scheinoperierten Tieren beobachtet [112]. Diese Ergebnisse passen gut zu den Resultaten von Liu et al., sie beobachteten im tierexperimentellen Modell am Hund nach Herzstillstand mit einer inspiratori-

schen Sauerstofffraktion ( $\text{FiO}_2$ ) von 100 % ein schlechteres neurologisches Outcome beobachteten als mit einer  $\text{FiO}_2$  von 21 % Sauerstoff [114]. Des Weiteren untersuchte diese Arbeitsgruppe die durch freie Radikale ausgelöste Lipidperoxidation im Hirngewebe, die ebenfalls signifikant erhöht war und durch die vor allem 13- und 9-Hydroxyoctadecadienoidsäuren gebildet wurden. Tiere, die mit 21 % oder 30 % Sauerstoff beatmet wurden, zeigten signifikant niedrigere Konzentrationen von 13- und 9-Hydroxyoctadecadienoid Säuren in  $\mu\text{g pro g Gewebe}$  und ein besseres neurologisches Outcome [114]. Es deutet viel darauf hin, dass der PDHC bei oxidativem Stress, sei es durch Hemmung der Aktivität oder Schädigung des Enzymkomplexes, beeinflusst wird und seine Aktivitätseinschränkung zu einer Einschränkung des oxidativen Stoffwechsels und somit zu neuronalem Zellschaden führen kann. 1988 nahmen Lai et al. *in vitro* bereits an, dass ein erhöhter Calciumspiegel maßgeblich für neuronalen Zelltod nach einem ischämischen Ereignis verantwortlich sei. In ihren Untersuchungen konnten sie eine Erhöhung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration in den Mitochondrien nachweisen, in Kombination mit einer Einschränkung der PDHC-Aktivität [115]. Gegenätzlich zu diesen Ergebnissen muss angeführt werden, dass  $\text{Ca}^{2+}$  aktivierend auf den PDHC wirkt (siehe 1.3.3.1). Eine  $\text{Ca}^{2+}$ -Überladung der Mitochondrien hingegen ist ein kritisches Ereignis sowohl in apoptotischem als auch in nekrotischem neuronalen Zelluntergang, wie Kruman et al. mit Hilfe von *in vitro* Versuchen herausfanden [116]. Im Gegensatz dazu zeigten Pandya et al. in ihren Versuchen am Rattenhirn nach traumatischen Hirnverletzungen und Rückenmarkstraumata zwar eine calciumabhängige Hemmung der mitochondrialen Atmung, allerdings ohne Beeinflussung der Aktivität des PDHC oder der NADH-Dehydrogenase (Komplex I) [117]. Unter Berücksichtigung der verschiedenen Mechanismen, die die Leistung des PDHC beeinflussen, könnten verschiedene Stationen der Regulation des PDHC für eine Reduktion der Enzymkomplexleistung verantwortlich sein. Die Ergebnisse dieser Untersuchung lassen keine Schlussfolgerung über den Ort der Schädigung des Enzymkomplexes zu. Eine multifaktorielle Genese der Aktivitätsabnahme der PDHC nach SAB ist ebenso denkbar.

#### 4.3.1.1 Oxidative Energiegewinnung (experimentell und klinisch) nach SAB

Störungen des Stoffwechsels und die Anhäufung von Stoffwechselmetaboliten nach einer SAB wurden bereits in verschiedenen Studien mit unterschiedlichen Ansätzen beobachtet. Über das Einbringen von Blut in die Cisterna magna bei Hunden mit einer konsekutiven Erhöhung des Liquorlaktatspiegels und -pyruvatspiegels beispielsweise schon im Jahre 1975 [118]. Weiterhin wurden Positronenemissionstomographie (PET)- und Mikrodialysestudien durchgeführt. Carpenter et al. fanden in ihren PET-Studien eine signifikante Abnahme der zerebralen Sauerstoff-Stoffwechselrate bei Patienten nach SAB, auch wenn sich in der zerebralen Angiographie kein Hinweis für einen Vasospasmus ergab [119]. Diese Beobachtungen wurden als primäre metabolische Veränderung und eine Loslösung vom zerebralen Blutfluss und des Stoffwechsels interpretiert; bei Messungen an Tag eins bis vier nach der SAB [119]. Hier wird dementsprechend aufgezeigt, dass die metabolischen Veränderungen über mehrere Tage andauern. Bei bis zu 70 % aller SAB Patienten kommt es zu einem Vasospasmus, vor allem in der Gruppe der 30-39-jährigen Patienten [120], allerdings entwickeln „nur“ 20-30 % der SAB-Patienten ein sekundär neurologisches Defizit [120, 121]. Möglicherweise reicht ein alleiniger Vasospasmus nicht aus den CBF so zu drosseln, dass er unter die ischämische Schwelle fällt. Um die ischämische Schwelle zu unterschreiten, könnte demzufolge ein weiterer, additiver Faktor notwendig sein. So könnte eine zusätzliche Einschränkung des oxidativen Metabolismus, die für sich alleine genommen ebenfalls noch nicht für einen ischämischen Schaden sorgt, die Zellen in diesem Status der reduzierten Hirndurchblutung irreversibel schädigen. Mikrodialysestudien stellten bei SAB-Patienten nach der SAB erhöhte Werte für Laktat und Pyruvat und damit verbunden einen erhöhten Laktat-Pyruvat-Quotienten (L:P L/P-Ratio) sowie erhöhte Werte für Glutamat und auch Glycerol heraus [122, 123], die an verschiedenen Zeitpunkten nach einer SAB gemessen wurden. Der Laktat-Pyruvat-Quotient wurde von der Arbeitsgruppe von Sarrafzadeh als zuverlässigster unabhängiger metabolischer Marker für das 12-Monats-Outcome der SAB angenommen [124]. In ihrer Arbeit aus dem Jahr 2004 kommen die Autoren zu der Schlussfolgerung, dass ein genaueres Verständnis des gestörten zerebralen Metabolismus nötig ist, um entsprechende Therapeutika zu identifi-

zieren [124]. In Abbildung 18 ist der PDHC in Zusammenschau mit dem Zitratzyklus dargestellt, um die entscheidende Position in der Energiegewinnung zu veranschaulichen. Funktioniert der Enzymkomplex nicht oder nur eingeschränkt, kommt es zur Anhäufung von Pyruvat innerhalb des Mitochondriums und auch im Zytosol der Zellen, was letztlich zu einer Laktatazidose führt. So wird noch einmal die entscheidende Aufgabe des PDHC deutlich.



**Abbildung 18:** Schematische Darstellung des Zitratzyklus mit Veränderungen nach einer SAB (selbst erstellt) [62]

Auch Zetterling et al. fanden 2011 im Rahmen einer Mikrodialysestudie bei Patienten nach SAB signifikant erhöhte Laktat- und Pyruvatkonzentrationen nach SAB und kamen durch parallele Messung der Glukosespiegel zu der Schlussfolgerung, dass innerhalb einer Woche nach einer SAB eine hyperglykämische Situation vorliegt und der zerebra-

le Glukoseverbrauch erhöht ist [125]. Insgesamt sind Informationen aus der Frühphase nach SAB, die Aufschluss über die zerebrale Stoffwechselsituation geben, spärlich. Westermaier et al. beobachteten am tierexperimentellen Modell an Ratten aber die gleichen metabolischen Veränderungen wie oben bereits beschrieben in den ersten sechs Stunden nach SAB [49]. Dies deutet darauf hin, dass es bereits sehr früh nach SAB zu einer Einschränkung der metabolischen Aktivität der Zellen kommt [49]. Darüber hinaus könnte die beobachtete Erhöhung des Sauerstoffpartialdrucks im Hirngewebe Ausdruck einer Akkumulation von Sauerstoff im Hirngewebe sein, der bei eingeschränktem oxidativem Stoffwechsel trotz ausreichender Hirndurchblutung nicht verwertet werden kann [48]. Richards et al. zeigten in experimentellen Untersuchungen an Hunden, dass die PDHC-Aktivität nach zerebraler Ischämie und Reperfusion vor allem im Hippocampus eingeschränkt ist [101]. Eine Peroxynitrit-abhängige PDHC-Aktivitätsabnahme kommt bei oxidativem Stress zum Tragen [101]. Im Gegensatz dazu liegt in dem hier vorliegenden Versuchsmodell eine „low-flow“ Situation nach der SAB vor. Somit weisen die Daten darauf hin, dass eine PDHC-Aktivitätseinschränkung nicht auf die Ischämie und Reperfusionssituation beschränkt bleibt, sondern auch im Status chronisch reduzierter Hirndurchblutung auftritt bzw. unterhalten wird. Eine erhöhte Konzentration des PDHC im Bereich des Hippocampus kann in den vorliegenden Versuchen bestätigt werden. Während dieser Versuche kam es im Durchschnitt nach etwa 30 Minuten zu einer vollständigen oder nahezu vollständigen Erholung des CPP nach der SAB. In einem Review-Artikel von Roche et al. wird aufgezeigt, dass eine Aktivitätssteigerung des PDHC zu einer Reduktion des Schadens im Herzmuskel bei Ischämie führen kann und dass eine Aktivitätssteigerung des Enzymkomplexes bei Diabetes mellitus zu einer Reduktion des Blutglukosespiegels führt [61]. Übertragen auf die hier vorliegenden Ergebnisse könnte das bedeuten, dass eine Aktivitätssteigerung des Enzymkomplexes nach einer SAB möglicherweise zu einer besseren Energieversorgung des Hirngewebes führt. Die nach der SAB erhöhte Glukosekonzentration im Blut könnte somit effizient über die Glykolyse und mit Hilfe des PDHC eingeschleust in den Zitratzyklus abgebaut werden. So könnte einer Laktatazidose, die durch den Laktatanstieg im Rahmen der anaeroben Glykolyse entsteht, vorgebeugt werden und

die Hirngewebschädigung nach einer SAB verringert werden. Eine Laktatazidose im Hirngewebe nach Ischämie führt zu irreversiblen Zellschaden, wie Kalimo et al. 1981 zeigten [126]. Eine oben bereits beschriebene weitere mögliche Ursache für die Aktivitätsabnahme des PDHC könnten, wie Martin et al. aus ihren Versuchen schlussfolgerten, reaktive Sauerstoff- und auch Stickstoffspezies sein, da der PDHC sensibel auf diese reagiert [67]. Die rechtzeitige und ausreichende Reperfusion von ischämischem Gewebe ist essentiell für das Fortbestehen des Organs. Allerdings kann die Reperfusion auch zu Schäden und Apoptose führen, wie im Folgenden näher beschrieben wird. Chouchani et al. zeigten, dass in vielen Gewebearten der Grund für einen Anstieg reaktiver Sauerstoff- und Stickstoffspezies eine Akkumulation des während des Zitratzyklus entstehenden Succinats ist [127]. Dadurch entstehen intramitochondrial reaktive Sauerstoffspezies während der Reperfusion, die in vivo einen positiven Effekt auf reperfusionsbedingten Schaden durch eine Eindämmung der Succinatakkumulation zeigten [127]. Nakagawa et al. schlussfolgerten 1990 aus ihren Untersuchungen an Ratten eine reperfusionsbedingte abnorme Gefäßpermeabilität für Makromoleküle als Korrelat eines schweren Schadens der Blut-Hirn-Schranke [128]. Ein weiterer Grund für neuronalen Zellschaden und Zelltod ist der Einstrom von Calcium in die Zellen und Mitochondrien. Die daraus resultierende zelluläre und mitochondriale Calciumüberladung führt zu einer Dysfunktion der Mitochondrien [129]. Der erhöhte Calciumspiegel steigert die Aktivität von Phosphatasen, Endonukleasen und Proteasen und es kommt zur Proteo- und Lipolyse. Dies führt letztlich zur Störung von Membran- und Gefäßfunktionen und zum Zelltod durch die unterschiedlichen Kaskaden [130]. In vivo- und in vitro-Versuche zeigten, dass der Anstieg des Calciumspiegels vor allem durch glutamatabhängige Kanäle erfolgt [131]. Dem gegenüber stehen Untersuchungen von Wan et al. aus dem Jahr 1989; sie zeigten, dass der PDHC ohne Calcium ebenfalls stark in seiner Aktivität eingeschränkt ist [132]. Singh et al. kamen in ihren Untersuchungen zu dem Ergebnis, dass ein ausschließlich erhöhter Calciumspiegel noch nicht für strukturelle und funktionelle Einbußen der Mitochondrien verantwortlich ist, in Kombination mit erhöhten Werten reaktiver Sauerstoffmetabolite und mitochondrialem Thiol aber zu einer Dysfunktion der Mitochondrien führt [133]. Es

zeigten auch Rehncrona et al. im Jahre 1979 am Rattengehirn eine persistierende Funktionseinschränkung der Mitochondrien nach inkompletter Ischämie und darauffolgender Reperfusion [134]: Sie postulierten, dass frühe Ereignisse während der Reperfusion für die Einbußen der Energieversorgung mitverantwortlich seien [134].

Persson et al. fanden in ihren Mikrodialyse-Studien nach SAB signifikant höhere Konzentrationen von exzitatorischen Aminosäuren bei Patienten mit schlechterem Outcome als bei Patienten, die sich gut oder zumindest moderat von einer SAB erholten [135]. Sie schlussfolgerten, dass die Glutamatakkumulation und die damit verbundene Glutamatrezeptorüberaktivität eine Rolle bei der neuronalen Zellschädigung nach der SAB spielt [135]. Des Weiteren fanden sie, dass der Laktat-Pyruvat-Quotient signifikant mit dem klinischen Outcome korreliert [135]. Eine metabolische Krise wird definiert durch einen Laktat-Pyruvat-Quotienten von  $> 40$  und eine Mikrodialyse Glukosekonzentration von  $< 0,7$  mmol/l [136]. Dies unterstützt die hier vorliegenden Ergebnisse einer verminderten PDHC-Aktivität nach SAB: es kommt zu einem Missverhältnis von Energiebedarf und –angebot, wobei der Energiebedarf nicht gedeckt wird. Dies wird beeinflusst von der systemischen Glukosekonzentration, der Bluthirnschrankendurchlässigkeit und auch der Funktionsfähigkeit der Glukosetransporter [125].

Die in der vorliegenden Arbeit gezeigte eingeschränkte PDHC-Aktivität könnte eine Ursache für die Einschränkung in der aeroben Energiegewinnung sein. Diese Einschränkung könnte sowohl für eine Glukose- und Sauerstoffakkumulation im Hirngewebe als auch für die erhöhten Glutamat- und für erhöhte Laktat- und Pyruvatkonzentrationen mit verantwortlich sein und damit auch zu dem schlechten Outcome von SAB-Patienten beitragen.

Eine eingeschränkte zerebrale Sauerstoffmetabolisierung nach der SAB wurde auch 1991 von Carpenter et al. gezeigt [119]. Diesbezüglich bleiben hier Fragen offen, die Anstoß zu weiteren Untersuchungen sein könnten: Insbesondere wäre zu klären ob es sich um ein Problem exklusiv den PDHC betreffend handelt oder auch andere Enzyme, z. B. der mitochondrialen Atmungskette, beteiligt sind? Außerdem ist denkbar, dass angesichts der unterschiedlichen Faktoren, die eine Aktivitätssteigerung oder –

hemmung des PDHC herbeiführen können, verschiedene Mechanismen, die sich möglicherweise gegenseitig potenzieren oder auch abschwächen können, für Funktionseinbußen des PDHC verantwortlich sind.

#### 4.3.1.2 Metabolismus nach Ischämie/Reperfusionsschaden im Vergleich zur SAB

Messungen des zerebralen Glukosemetabolismus und des zerebralen Sauerstoffverbrauchs nach globaler Ischämie und Reperfusion deuten darauf hin, dass der zerebrale Metabolismus merklich eingeschränkt ist [137]. Oxidativer Stress, der nach einer Ischämie auftritt, führt zur mitochondrialen Funktionseinschränkung wie Fiskum et al. 2008 feststellten [138]. Beispielsweise reagiert Komplex I der Elektronentransportkette in der Mitochondrienmembran sehr sensibel auf oxidativen Stress, allerdings auch auf Ischämie und Reperfusion selbst. Des Weiteren nimmt während einer Ischämie-Reperfusionsphase in den Mitochondrien die Aktivität des PDHC und die Konzentration von NADH<sup>+</sup> als mitochondriale Reaktion auf eine Einschränkung des Metabolismus ab [102, 139]. Diese mitochondriale Reaktion hat ebenfalls zur Folge, dass die oxidative Phosphorylierung und damit die Energiegewinnung weiter behindert werden. Bereits nach 10-minütiger Ischämie, die auch im Rahmen einer SAB im Sinne einer globalen Ischämie besteht, kommt es zu einem 35 %igen Abfall der Rate an oxidativer Phosphorylierung [140], die maßgeblich an der Energiegewinnung der Zellen beteiligt ist, so dass auch hier eine mögliche Ursache einer eingeschränkten Energiegewinnung liegen könnte. Besonders Neurone sind durch ihren hohen Energiebedarf auf eine oxidative mitochondriale Energiegewinnung angewiesen [141]. Als Ausweg steht den Zellen die anaerobe Energiegewinnung mittels Glykolyse zur Verfügung, die mit einem erheblichen Energieverlust pro Glukosemolekül einhergeht. Ein weiterer negativer Aspekt des anaeroben Glukoseabbaus ist die damit einhergehende pH-Senkung der Zellen. Ursache dafür ist die Anhäufung von Laktat, welches beim anaeroben Abbau von Glukose als Nebenprodukt bei der anaeroben Glykolyse entsteht [66]. Eine Gewebeazidose führt zum Anschwellen der Zellen, wovon besonders Astrozyten betroffen sind. Die extrazelluläre Ca<sup>2+</sup>-Konzentration wird als maßgeblicher Faktor angenommen [142].

Der Laktat/Pyruvat-Quotient wurde von Sarrafzadeh et al. als einer von vier unabhängigen prognostischen Faktoren für das 12-Monats-Outcome nach SAB angegeben [124]. Der Laktat/Pyruvat-Quotient erwies sich sogar als sensitivstes und spezifischstes Korrelat einer Ischämie, wenn diese länger andauerte [39]. Fiskum et al. beobachteten in ihren Versuchen weiterhin, dass Herzstillstand und Reanimation die Aktivität und Immunreaktivität des PDHC reduzierten. Die Einschränkung dieses Enzymkomplexes könnte ursächlich für persistierend hohe und schädliche Laktatspiegel nach Ischämie und Reperfusion sein [138]. Dass es nach einer Ischämie und Reperfusion zu abnormal hohen Laktatspiegeln kommt, konnte schon früher von Bogaert et al. gezeigt werden [105]. Die reduzierte PDHC-Aktivität nach Ischämie/Reperfusion gilt auch als Erklärungsansatz für den insgesamt reduzierten Glukosemetabolismus [143, 144]. Zumindest zu Beginn der SAB steht die globale Hirnischämie und es bleibt zu klären, inwieweit die genannten Ergebnisse der Untersuchungen am Ischämie/Reperusionsmodell für die SAB zutreffen und möglicherweise durch die initiale Ischämie in Gang gesetzt werden.

#### 4.3.2 Ischämie und Niedrig-Flusssituation nach SAB

Durch die SAB kommt es zu einer blutbedingten, plötzlichen intrakraniellen Volumenzunahme, diese führt zu einem Hirndruckanstieg, der die Höhe des diastolischen systemischen arteriellen Blutdrucks erreichen kann [145]. Schon der erhöhte Hirndruck alleine bewirkt mechanisch einen zerebralen Durchblutungsabfall. Zudem konnten Einschränkungen der Sauerstoff-Stoffwechselrate ( $CMRO_2$ ) von 25 % nach SAB beobachtet werden und infolge der eingeschränkten  $CMRO_2$  eine erniedrigte zerebrale Durchblutung (CBF) [119]. Eine stark verminderte zerebrale Durchblutung ist in der Initialphase nach SAB sowohl tierexperimentell als auch klinisch nachgewiesen worden [146, 147]. Bereits 1973 konnten Petruk et al. in Versuchen mit Affen eine Erniedrigung des CBF nach SAB nachweisen [148]. Nach einiger Zeit normalisiert sich der Hirndruck wieder, was eine Erholung der Hirnperfusion günstig beeinflusste. Es kommt demzufolge nach der kurzen globalen Ischämiephase zu einer Reperfusion des Hirngewebes,

allerdings besteht weiterhin eine low flow Situation. Besonders vulnerabel reagieren die Zellen des Hippocampus auf die Veränderungen [101].

#### 4.3.3 Therapeutische Optionen

Die in dieser Arbeit vorliegenden Ergebnisse zeigen eine Aktivitätsabnahme des PDHC auf. Die in früheren Studien festgestellte Einschränkung der aeroben Energiegewinnung könnte Folge dieser Aktivitätsabnahme sein. Da hier einer der möglichen pathophysiologischen Faktoren für den Hirnschaden nach SAB liegt, könnte eine Stimulation des PDHC in der Frühphase der SAB neuroprotektiv wirken. Eine Verhinderung einer PDHC-Inaktivierung, sowie einer metabolischen Entgleisung oder ein Ausgleich einer bestehenden metabolischen Imbalance, könnte eine Schutzfunktion mit sich bringen und neuroprotektiv wirken. Eine Stimulierung des PDHC ist in der Literatur durch alpha-Liponsäure beschrieben. Frölich et al. beobachteten post mortem eine diskrete Aktivierung des PDHC im parietalen Kortex von Patienten mit vaskulär bedingter Demenz sowie bei Patienten der Kontrollgruppe durch alpha-Liponsäure [149]. Eine Untermauerung dieser Hypothese könnten Untersuchungen von Panigrahi et al. aus dem Jahr 1996 sein, die zeigten, dass alpha-Liponsäure das Überleben nach zerebraler Ischämie steigert und das Gehirn vor neuronalen Schäden durch Reperfusion schützt [150]. Weiterhin zeigten Deng et al. 2015, dass alpha-Liponsäure neuroprotektiv gegen Ischämie/Reperfusionsschäden im Rattengehirn wirkt, da eine Vorbehandlung mit diesem Therapeutikum eine geringere Größe des entstehenden Infarktareals mit sich brachte [151]. Nicklas et al. beschrieben in ihren in vitro-Versuchen eine Steigerung des Pyruvatumsatzes bei erhöhter Kaliumkonzentration [152]. Sie sahen eine möglicherweise direkte Stimulation des PDHC durch Kalium als Ursache dafür [152]. Hier könnte somit ein weiterer Therapieansatz mit Steigerung der PDHC-Aktivität liegen. Nach zerebraler Ischämie sowohl im Tierversuch als auch beim Menschen wurde nach  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanalblocker-Gabe ein positiver Effekt beobachtet:  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanalblocker (Nimodipin) zeigten einen positiven Effekt auf metabolische Parameter, histologisch erfassbare Gewebeschädigung und das klinische/neurologische Outcome, wobei der zu Grunde

liegende Mechanismus nicht vollständig geklärt ist [153, 154]. Berger et al. untersuchten hierzu die alleinige Ischämie mittels Okklusion der A. cerebri media gegenüber der Okklusion mit einer vorangegangenen Glucoseinfusion [154]. Weiterhin beobachteten Nunez-Figuereade et al. in Rattenhirnen nach oraler Applikation von JM-20, eines neuen 1,5-Benzodiazepins eine weniger ausgeprägte Calciumakkumulation und eine reduzierte Glutamat- und Aspartatkonzentration im Liquor; weiterhin konnten sie eine Reduktion neuronalen Zelltodes in hippocampalen Zellen in histologischen Schnittpräparate verzeichnen und in vivo eine signifikante Verbesserung des neurologischen Defizites beobachten [155]. Über eine Hemmung der Pyruvatdehydrogenase-Kinase durch Dichloracetat, welches bei Patienten mit PDHC-Verlust gegeben wird, konnte eine Aktivitätssteigerung des PDHC bereits gezeigt werden [67]. In Tierversuchen zu globaler und lokaler Ischämie führte Dichloracetat zum Absinken des Laktatspiegels im Gehirn und verbesserte das neurologische Outcome [156, 157]. Corbett et al. fanden zudem, dass die Auswirkungen im kindlichen Gehirn größer sind als in erwachsenen Gehirnen [158]. Bei Patienten wurde MR-spektroskopisch zwei Tage nach einem Schlaganfall ebenfalls nach Dichloracetat-Gabe ein Absinken des Laktatspiegels im Gehirn beobachtet, wobei die Werte nicht statistisch signifikant waren, sondern Trends darstellten [159]. Eine weitere Option für eine neuroprotektive Therapie könnte eine Umgehung des PDHC darstellen. Durch eine direkte Zuführung von Reagenzien in den Citratzyklus wäre eine 100 %ige Aktivität des PDHC, um die aerobe effiziente Energiegewinnung aufrecht zu erhalten, nicht erforderlich. Dies wäre durch Acetyl-L-Carnitin (ALCAR) oder Ketonkörper, wie beispielsweise Beta-Hydroxybutyrat, denkbar. Unterstützend für diese These könnte eine Arbeit von Rosenthal et al. am Hundemodell sein, in der die intravenöse Gabe von ALCAR direkt nach einem Herzstillstand zu einer Reduktion des Laktatspiegels führte und das neurologische Outcome verbesserte [160]. L-propionyl-carnitine führte zu einer Reduktion des ischämischen Schadens und sorgte für einen Schutz der mitochondrialen Funktion in ischämischen Rattenherzen [161]. Der möglicherweise an der Dysfunktion des PDHC (mit)verantwortliche oxidative Stress, könnte durch Antioxidantien behandelt werden, die die Funktionsfähigkeit des Enzymkomplexes verbessern und somit zu einer Neuroprotektion führen könnten. Die

hier aufgeführten Therapieoptionen, die potentiell Schutz vor einer Dysfunktion des PDHC bieten, sind - mit Ausnahme der Antioxidantien - nach ausführlicher Literaturrecherche in der Frühphase der SAB bisher nicht getestet worden.

#### 4.4 Klinische Bedeutung und translationaler Ansatz

Da den besten prognostischen Faktor des Outcomes der SAB weiterhin der neurologische Zustand des Patienten bei seiner Krankenhausaufnahme darstellt, soll diese Arbeit einen Teil dazu beitragen, in diesem frühen zeitlichen Fenster der SAB eine effektive Therapieoption zu finden. Optimalerweise könnte eine solche Therapie in der prähospitalen Phase bei dem Verdacht auf eine SAB zu einer Verbesserung des Outcomes führen und im Sinne einer Notfalltherapie eingesetzt werden. Klinische Studien, die diese frühe Phase der SAB untersuchen, gibt es zum aktuellen Zeitpunkt noch nicht. Hier gilt es zunächst weitere detaillierte Erkenntnisse über die pathophysiologischen Vorgänge in dieser Phase zu erlangen.

## 5 Zusammenfassung

In der hier vorliegenden Arbeit konnte zum ersten Mal eine Reduktion der Aktivität des PDHC in der Frühphase nach einer SAB im Tierversuch in der Ratte gezeigt werden. Da der PDHC bei der effizienten aeroben Energiegewinnung durch die Einschleusung von Pyruvat in den Zitratzyklus, den entscheidenden Enzymkomplex darstellt, könnte eine Aktivitätsminderung des PDHC ein möglicher Faktor für einen sekundären Hirnschaden und neuronalen Zellschaden nach einer SAB sein. Dass der lange als entscheidend für das schlechte Outcome von SAB-Patienten verantwortlich gemachte verzögerte Vasospasmus nach einer SAB alleine nicht für den sekundären Hirnschaden im Rahmen dieser Erkrankung herhalten kann, wird dadurch unterstrichen, dass der Vasospasmus mittlerweile gut therapiert werden kann, diese Therapie das Outcome der SAB aber nicht signifikant verbessert hat. Eine metabolische Komponente des sekundären Hirnschadens, möglicherweise kombiniert mit einer arteriellen Vasokonstriktion, sollte nach den Ergebnissen dieser Studie durchaus in Betracht gezogen werden. Die Ergebnisse stellen den PDHC als mögliches Ziel für eine neuroprotektive Therapie der SAB heraus. Eine suffiziente Stimulierung des PDHC oder ein Schutz des Enzymkomplexes vor Inaktivierung oder Schädigung könnte in der Frühphase der SAB protektiv wirken. Die Ergebnisse der hier vorliegenden Arbeit sind somit von klinischer Relevanz und sollten Anlass zu weiteren, auch klinischen Studien im Bereich der Funktionsbeeinflussung des PDHC geben. Weiterhin scheint eine Untersuchung weiterer metabolischer Schritte gewinnbringend, um weitere mögliche Angriffspunkte einer gezielten Therapie zu identifizieren.

## 6 Literatur und Abbildungsverzeichnis

### 6.1 Literaturverzeichnis

1. Kellner P, Stoevesandt D, Soukup J, Bucher M, Raspe C: **[Aneurysmal subarachnoid hemorrhage]**. *Der Anaesthetist* 2012, **61**(9):792-814.
2. van Gijn J, Rinkel GJ: **Subarachnoid haemorrhage: diagnosis, causes and management**. *Brain : a journal of neurology* 2001, **124**(Pt 2):249-278.
3. Martins AN, Doyle TF, Newby N, Kobrine AI, Ramirez A: **The effect of a simulated subarachnoid hemorrhage on cerebral blood flow in the monkey**. *Stroke; a journal of cerebral circulation* 1975, **6**(6):664-672.
4. Diener H-C: **Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie**, vol. 3; 2005.
5. de Rooij NK, Linn FH, van der Plas JA, Algra A, Rinkel GJ: **Incidence of subarachnoid haemorrhage: a systematic review with emphasis on region, age, gender and time trends**. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry* 2007, **78**(12):1365-1372.
6. Feigin VL, Rinkel GJ, Lawes CM, Algra A, Bennett DA, van Gijn J, Anderson CS: **Risk factors for subarachnoid hemorrhage: an updated systematic review of epidemiological studies**. *Stroke; a journal of cerebral circulation* 2005, **36**(12):2773-2780.
7. Schievink WI, Torres VE, Piepgras DG, Wiebers DO: **Saccular intracranial aneurysms in autosomal dominant polycystic kidney disease**. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 1992, **3**(1):88-95.
8. Rubinstein MK, Cohen NH: **Ehlers-Danlos Syndrome Associated with Multiple Intracranial Aneurysms**. *Neurology* 1964, **14**:125-132.
9. Finney LH, Roberts TS, Anderson RE: **Giant intracranial aneurysm associated with Marfan's syndrome. Case report**. *Journal of neurosurgery* 1976, **45**(3):342-347.
10. MC S: **Die aneurysmatische Subarachnoidalblutung: Epidemiologie, Ätiologie, Klinik und Komplikationen**. *Journal für Neurologie, Neurochirurgie und Psychiatrie* 2008, **9**:20-30.
11. Fontanarosa PB: **Recognition of subarachnoid hemorrhage**. *Annals of emergency medicine* 1989, **18**(11):1199-1205.
12. Seule MA, Stienen MN, Cadosch D, Fournier JY, Lussmann R, Hildebrandt G, Gautschi OP: **[Aneurysmal subarachnoid hemorrhage - therapy and complications]**. *Anesthesiologie, Intensivmedizin, Notfallmedizin, Schmerztherapie : AINS* 2010, **45**(1):8-17.
13. H. Theilen TK, M. Leimert, Th. Koch: **Diagnosis and therapy of the non traumatic subarachnoid haemorrhage**. *Anästhesiologie und Intensivmedizin* 2013:14-25.
14. Ibrahim GM, Macdonald RL: **Electrocardiographic changes predict angiographic vasospasm after aneurysmal subarachnoid hemorrhage**. *Stroke; a journal of cerebral circulation* 2012, **43**(8):2102-2107.
15. Murthy SB, Shah S, Rao CP, Bershah EM, Suarez JI: **Neurogenic Stunned Myocardium Following Acute Subarachnoid Hemorrhage: Pathophysiology and Practical Considerations**. *Journal of intensive care medicine* 2013.
16. Kruyt ND, Musters A, Biessels GJ, Devries JH, Coert BA, Vergouwen MD, Horn J, Roos YB: **Beta-cell dysfunction and insulin resistance after subarachnoid haemorrhage**. *Neuroendocrinology* 2011, **93**(2):126-132.
17. Hockel K, Scholler K, Trabold R, Nussberger J, Plesnila N: **Vasopressin V(1a) receptors mediate posthemorrhagic systemic hypertension thereby determining rebleeding**

- rate and outcome after experimental subarachnoid hemorrhage. *Stroke; a journal of cerebral circulation* 2012, **43**(1):227-232.
18. Diringer MN, Bleck TP, Claude Hemphill J, 3rd, Menon D, Shutter L, Vespa P, Bruder N, Connolly ES, Jr., Citerio G, Gress D *et al*: **Critical care management of patients following aneurysmal subarachnoid hemorrhage: recommendations from the Neurocritical Care Society's Multidisciplinary Consensus Conference.** *Neurocritical care* 2011, **15**(2):211-240.
  19. Wartenberg KE, Mayer SA: **Medical complications after subarachnoid hemorrhage.** *Neurosurgery clinics of North America* 2010, **21**(2):325-338.
  20. Keedy A: **An overview of intracranial aneurysms.** *McGill journal of medicine : MJM : an international forum for the advancement of medical sciences by students* 2006, **9**(2):141-146.
  21. Diener H-CP: **Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie:** Thieme, Stuttgart; 2008.
  22. Diener H-C WC: **Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie: Herausgegeben von der Kommission "Leitlinien" der DGN,** 5 edn: Thieme Verlag, Stuttgart; 2012.
  23. le Roux AA, Wallace MC: **Outcome and cost of aneurysmal subarachnoid hemorrhage.** *Neurosurgery clinics of North America* 2010, **21**(2):235-246.
  24. Gomis P, Rousseaux P, Jolly D, Graftieaux JP: **[Initial prognostic factors of aneurysmal subarachnoid hemorrhage].** *Neuro-Chirurgie* 1994, **40**(1):18-30.
  25. Aulmann C, Steudl WI, Feldmann U: **[Validation of the prognostic accuracy of neurosurgical admission scales after rupture of cerebral aneurysms].** *Zentralblatt für Neurochirurgie* 1998, **59**(3):171-180.
  26. Rosen DS, Macdonald RL: **Subarachnoid hemorrhage grading scales: a systematic review.** *Neurocritical care* 2005, **2**(2):110-118.
  27. Deruty R, Pelissou-Guyotat I, Mottolese C, Amat D, Bognar L: **Level of consciousness and age as prognostic factors in aneurysmal SAH.** *Acta neurochirurgica* 1995, **132**(1-3):1-8.
  28. Hunt WE, Hess RM: **Surgical risk as related to time of intervention in the repair of intracranial aneurysms.** *Journal of neurosurgery* 1968, **28**(1):14-20.
  29. Kistler JP, Crowell RM, Davis KR, Heros R, Ojemann RG, Zervas T, Fisher CM: **The relation of cerebral vasospasm to the extent and location of subarachnoid blood visualized by CT scan: a prospective study.** *Neurology* 1983, **33**(4):424-436.
  30. Fisher CM, Kistler JP, Davis JM: **Relation of cerebral vasospasm to subarachnoid hemorrhage visualized by computerized tomographic scanning.** *Neurosurgery* 1980, **6**(1):1-9.
  31. Frykholm P, Andersson JL, Langstrom B, Persson L, Enblad P: **Haemodynamic and metabolic disturbances in the acute stage of subarachnoid haemorrhage demonstrated by PET.** *Acta neurologica Scandinavica* 2004, **109**(1):25-32.
  32. d'Avella D, Ciccirello R, Zuccarello M, Albiero F, Romano A, Angileri FF, Salpietro FM, Tomasello F: **Brain energy metabolism in the acute stage of experimental subarachnoid haemorrhage: local changes in cerebral glucose utilization.** *Acta neurochirurgica* 1996, **138**(6):737-743; discussion 744.
  33. Hayashi T, Suzuki A, Hatazawa J, Kanno I, Shirane R, Yoshimoto T, Yasui N: **Cerebral circulation and metabolism in the acute stage of subarachnoid hemorrhage.** *Journal of neurosurgery* 2000, **93**(6):1014-1018.
  34. Sarrafzadeh AS, Kaisers U, Boemke W: **[Aneurysmal subarachnoid hemorrhage. Significance and complications].** *Der Anaesthetist* 2007, **56**(9):957-966; quiz 967.

35. Yuksel S, Tosun YB, Cahill J, Solaroglu I: **Early brain injury following aneurysmal subarachnoid hemorrhage: emphasis on cellular apoptosis.** *Turkish neurosurgery* 2012, **22**(5):529-533.
36. Matsuda M, Shiino A, Handa J: **Sequential changes of cerebral blood flow after aneurysmal subarachnoid haemorrhage.** *Acta neurochirurgica* 1990, **105**(3-4):98-106.
37. Johnston IH, Rowan JO: **Raised intracranial pressure and cerebral blood flow. 3. Venous outflow tract pressures and vascular resistances in experimental intracranial hypertension.** *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry* 1974, **37**(4):392-402.
38. Bederson JB, Levy AL, Ding WH, Kahn R, DiPerna CA, Jenkins AL, 3rd, Vallabhajosyula P: **Acute vasoconstriction after subarachnoid hemorrhage.** *Neurosurgery* 1998, **42**(2):352-360; discussion 360-352.
39. Sarrafzadeh AS, Haux D, Ludemann L, Amthauer H, Plotkin M, Kuchler I, Unterberg AW: **Cerebral ischemia in aneurysmal subarachnoid hemorrhage: a correlative microdialysis-PET study.** *Stroke; a journal of cerebral circulation* 2004, **35**(3):638-643.
40. Friedrich V, Flores R, Sehba FA: **Cell death starts early after subarachnoid hemorrhage.** *Neuroscience letters* 2012, **512**(1):6-11.
41. Paton JF, Dickinson CJ, Mitchell G: **Harvey Cushing and the regulation of blood pressure in giraffe, rat and man: introducing 'Cushing's mechanism'.** *Experimental physiology* 2009, **94**(1):11-17.
42. N. Willner SK, C. Stetter, J. Hartmann, R.-I. Ernestus, T. Westermaier: **Neuroprotektion nach SAB: Der NO-Donator Nitroprussid verbessert die Hirndurchblutung nach experimenteller SAB.**
43. Zimmermann M, Seifert V: **Endothelin and subarachnoid hemorrhage: an overview.** *Neurosurgery* 1998, **43**(4):863-875; discussion 875-866.
44. Zimmermann M: **Endothelin in cerebral vasospasm. Clinical and experimental results.** *Journal of neurosurgical sciences* 1997, **41**(2):139-151.
45. Macdonald RL, Higashida RT, Keller E, Mayer SA, Molyneux A, Raabe A, Vajkoczy P, Wanke I, Bach D, Frey A *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 neurology* 2011, **10**(7):618-625.
46. Macdonald RL, Kassell NF, Mayer S, Ruefenacht D, Schmiedek P, Weidauer S, Frey A, Roux S, Pasqualin A: **Clazosentan to overcome neurological ischemia and infarction occurring after subarachnoid hemorrhage (CONSCIOUS-1): randomized, double-blind, placebo-controlled phase 2 dose-finding trial.** *Stroke; a journal of cerebral circulation* 2008, **39**(11):3015-3021.
47. Grubb RL, Jr., Raichle ME, Eichling JO, Gado MH: **Effects of subarachnoid hemorrhage on cerebral blood volume, blood flow, and oxygen utilization in humans.** *Journal of neurosurgery* 1977, **46**(4):446-453.
48. Westermaier T, Jauss A, Eriskat J, Kunze E, Roosen K: **Time-course of cerebral perfusion and tissue oxygenation in the first 6 h after experimental subarachnoid hemorrhage in rats.** *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 2009, **29**(4):771-779.
49. Westermaier T, Jauss A, Eriskat J, Kunze E, Roosen K: **The temporal profile of cerebral blood flow and tissue metabolites indicates sustained metabolic depression after experimental subarachnoid hemorrhage in rats.** *Neurosurgery* 2011, **68**(1):223-229; discussion 229-230.
50. Patel MS, Roche TE: **Molecular biology and biochemistry of pyruvate dehydrogenase complexes.** *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 1990, **4**(14):3224-3233.

51. Jeoung NH, Harris RA: **Role of pyruvate dehydrogenase kinase 4 in regulation of blood glucose levels.** *Korean diabetes journal* 2010, **34**(5):274-283.
52. M RG, Hoogmoed J, van Straaten HA, Coert BA, Peter Vandertop W, Verbaan D: **Time intervals from aneurysmal subarachnoid hemorrhage to treatment and factors contributing to delay.** *Journal of neurology* 2013.
53. Dorhout Mees SM, Rinkel GJ, Feigin VL, Algra A, van den Bergh WM, Vermeulen M, van Gijn J: **Calcium antagonists for aneurysmal subarachnoid haemorrhage.** *The Cochrane database of systematic reviews* 2007(3):CD000277.
54. Kronvall E, Undren P, Romner B, Saveland H, Cronqvist M, Nilsson OG: **Nimodipine in aneurysmal subarachnoid hemorrhage: a randomized study of intravenous or peroral administration.** *Journal of neurosurgery* 2009, **110**(1):58-63.
55. Tykocki T: **A dilemma regarding the optimal administration of nimodipine in the subarachnoid hemorrhage.** *Acta neurochirurgica* 2015, **157**(7):1131-1132.
56. Bashir A, Andresen M, Bartek J, Jr., Cortsen M, Eskesen V, Wagner A: **Intra-arterial nimodipine for cerebral vasospasm after subarachnoid haemorrhage: Influence on clinical course and predictors of clinical outcome.** *The neuroradiology journal* 2016, **29**(1):72-81.
57. Westermaier T, Stetter C, Vince GH, Pham M, Tejon JP, Eriskat J, Kunze E, Matthies C, Ernestus RI, Solymosi L *et al*: **Prophylactic intravenous magnesium sulfate for treatment of aneurysmal subarachnoid hemorrhage: a randomized, placebo-controlled, clinical study.** *Critical care medicine* 2010, **38**(5):1284-1290.
58. Dhar R, Scalfani MT, Zazulia AR, Videen TO, Derdeyn CP, Diringer MN: **Comparison of induced hypertension, fluid bolus, and blood transfusion to augment cerebral oxygen delivery after subarachnoid hemorrhage.** *Journal of neurosurgery* 2012, **116**(3):648-656.
59. Togashi K, Joffe AM, Sekhar L, Kim L, Lam A, Yanez D, Broeckel-Elrod JA, Moore A, Deem S, Khandelwal N *et al*: **Randomized pilot trial of intensive management of blood pressure or volume expansion in subarachnoid hemorrhage (IMPROVES).** *Neurosurgery* 2015, **76**(2):125-134; discussion 134-125; quiz 135.
60. Bersin RM, Stacpoole PW: **Dichloroacetate as metabolic therapy for myocardial ischemia and failure.** *American heart journal* 1997, **134**(5 Pt 1):841-855.
61. Roche TE, Hiromasa Y: **Pyruvate dehydrogenase kinase regulatory mechanisms and inhibition in treating diabetes, heart ischemia, and cancer.** *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 2007, **64**(7-8):830-849.
62. M. Königshoff TB: **Kurzlehrbuch Biochemie**, vol. 2: Thieme; 2007.
63. J. Rassow KH, R. Netzker, R. Deutzmann: **Biochemie**, vol. 1: Thieme; 2006.
64. Harris RA, Bowker-Kinley MM, Huang B, Wu P: **Regulation of the activity of the pyruvate dehydrogenase complex.** *Advances in enzyme regulation* 2002, **42**:249-259.
65. [[https://card2brain.ch/box/biochemie\\_4](https://card2brain.ch/box/biochemie_4)]
66. Stefan Silbernagel AD: **Taschenatlas Physiologie**, vol. 7; 2007.
67. Martin E, Rosenthal RE, Fiskum G: **Pyruvate dehydrogenase complex: metabolic link to ischemic brain injury and target of oxidative stress.** *Journal of neuroscience research* 2005, **79**(1-2):240-247.
68. Pettit FH, Pelley JW, Reed LJ: **Regulation of pyruvate dehydrogenase kinase and phosphatase by acetyl-CoA/CoA and NADH/NAD ratios.** *Biochemical and biophysical research communications* 1975, **65**(2):575-582.
69. Bowker-Kinley MM, Davis WI, Wu P, Harris RA, Popov KM: **Evidence for existence of tissue-specific regulation of the mammalian pyruvate dehydrogenase complex.** *The Biochemical journal* 1998, **329** ( Pt 1):191-196.

70. Robergs RA, Ghiasvand F, Parker D: **Biochemistry of exercise-induced metabolic acidosis.** *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology* 2004, **287**(3):R502-516.
71. Brooks GA: **What does glycolysis make and why is it important?** *J Appl Physiol (1985)* 2010, **108**(6):1450-1451.
72. Paschen W, Djuricic B, Mies G, Schmidt-Kastner R, Linn F: **Lactate and pH in the brain: association and dissociation in different pathophysiological states.** *Journal of neurochemistry* 1987, **48**(1):154-159.
73. Rehncrona S: **Brain acidosis.** *Annals of emergency medicine* 1985, **14**(8):770-776.
74. Ito H, Kanno I, Fukuda H: **Human cerebral circulation: positron emission tomography studies.** *Annals of nuclear medicine* 2005, **19**(2):65-74.
75. Tran-Dinh A, Depret F, Vigue B: **[Brain tissue oxygen pressure, for what, for whom?].** *Annales francaises d'anesthesie et de reanimation* 2012, **31**(6):e137-143.
76. Hoffman WE, Wheeler P, Edelman G, Charbel FT, Torres NJ, Ausman JI: **Hypoxic brain tissue following subarachnoid hemorrhage.** *Anesthesiology* 2000, **92**(2):442-446.
77. Oertel MF, Schwedler M, Stein M, Wachter D, Scharbrodt W, Schmidinger A, Boker DK: **Cerebral energy failure after subarachnoid hemorrhage: the role of relative hyperglycolysis.** *Journal of clinical neuroscience : official journal of the Neurosurgical Society of Australasia* 2007, **14**(10):948-954.
78. Veitch K, Hombroeckx A, Caucheteux D, Pouleur H, Hue L: **Global ischaemia induces a biphasic response of the mitochondrial respiratory chain. Anoxic pre-perfusion protects against ischaemic damage.** *The Biochemical journal* 1992, **281** ( Pt 3):709-715.
79. Dearden NM: **Mechanisms and prevention of secondary brain damage during intensive care.** *Clinical neuropathology* 1998, **17**(4):221-228.
80. Sokoloff L: **Relationships among local functional activity, energy metabolism, and blood flow in the central nervous system.** *Federation proceedings* 1981, **40**(8):2311-2316.
81. Valadka AB, Gopinath SP, Contant CF, Uzura M, Robertson CS: **Relationship of brain tissue PO<sub>2</sub> to outcome after severe head injury.** *Critical care medicine* 1998, **26**(9):1576-1581.
82. Takahashi S: **[Correlation of vasospasm and intracranial metabolism under experimental subarachnoid hemorrhage--Part 1. In reference with the acid-base-balance of cerebral blood and cerebrospinal fluid].** *No to shinkei = Brain and nerve* 1978, **30**(7):777-787.
83. Mizukami M, Kawase T, Usami T, Tazawa T: **Prevention of vasospasm by early operation with removal of subarachnoid blood.** *Neurosurgery* 1982, **10**(3):301-307.
84. Zabramski JM, Spetzler RF, Lee KS, Papadopoulos SM, Bovill E, Zimmerman RS, Bederson JB: **Phase I trial of tissue plasminogen activator for the prevention of vasospasm in patients with aneurysmal subarachnoid hemorrhage.** *Journal of neurosurgery* 1991, **75**(2):189-196.
85. Debdi M, Seylaz J, Sercombe R: **Increased influence of calcium and nifedipine on rabbit basilar artery reactivity after brief subarachnoid hemorrhage.** *Journal of cardiovascular pharmacology* 1993, **21**(5):754-759.
86. Clatterbuck RE, Gailloud P, Ogata L, Gebremariam A, Dietsch GN, Murphy KJ, Tamargo RJ: **Prevention of cerebral vasospasm by a humanized anti-CD11/CD18 monoclonal antibody administered after experimental subarachnoid hemorrhage in nonhuman primates.** *Journal of neurosurgery* 2003, **99**(2):376-382.

87. de Aguiar PH, Barros I, Paiva BL, Simm RF: **Removal of clots in subarachnoid space could reduce the vasospasm after subarachnoid hemorrhage.** *Acta neurochirurgica Supplement* 2013, **115**:91-93.
88. Guo J, Shi Z, Yang K, Tian JH, Jiang L: **Endothelin receptor antagonists for subarachnoid hemorrhage.** *The Cochrane database of systematic reviews* 2012, **9**:CD008354.
89. Chowdhury T, Dash HH, Cappellani RB, Daya J: **Early brain injury and subarachnoid hemorrhage: Where are we at present?** *Saudi journal of anaesthesia* 2013, **7**(2):187-190.
90. Sehba FA, Schwartz AY, Chereshev I, Bederson JB: **Acute decrease in cerebral nitric oxide levels after subarachnoid hemorrhage.** *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 2000, **20**(3):604-611.
91. Jiang JY, Lyeth BG, Clifton GL, Jenkins LW, Hamm RJ, Hayes RL: **Relationship between body and brain temperature in traumatically brain-injured rodents.** *Journal of neurosurgery* 1991, **74**(3):492-496.
92. Hasegawa Y, Latour LL, Sotak CH, Dardzinski BJ, Fisher M: **Temperature dependent change of apparent diffusion coefficient of water in normal and ischemic brain of rats.** *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 1994, **14**(3):383-390.
93. R. Büttner CT: **Allgemeine Pathologie**, vol. 3; 2003.
94. **ab109902-Pyruvate dehydrogenase (PDH) Enzyme Activity Microplate Assay Kit.** In. Edited by abcam; 2012: 4.
95. Barry CM, van den Heuvel C, Helps S, Vink R: **Cushing's mechanism maintains cerebral perfusion pressure in experimental subarachnoid haemorrhage.** *Neuroscience letters* 2012, **529**(1):92-96.
96. Paxinos G. WC: **The rat brain in stereotaxic coordinates**, vol. 5: Elsevier, academic press.
97. Lilla N, Fullgraf H, Stetter C, Kohler S, Ernestus RI, Westermaier T: **First Description of Reduced Pyruvate Dehydrogenase Enzyme Activity Following Subarachnoid Hemorrhage (SAH).** *Frontiers in neuroscience* 2017, **11**:37.
98. 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 neurochirurgica* 1984, **72**(1-2):79-94.
99. Westermaier T, Jauss A, Eriskat J, Kunze E, Roosen K: **Acute vasoconstriction: decrease and recovery of cerebral blood flow after various intensities of experimental subarachnoid hemorrhage in rats.** *Journal of neurosurgery* 2009, **110**(5):996-1002.
100. Sehba FA, Bederson JB: **Mechanisms of acute brain injury after subarachnoid hemorrhage.** *Neurological research* 2006, **28**(4):381-398.
101. Richards EM, Rosenthal RE, Kristian T, Fiskum G: **Postischemic hyperoxia reduces hippocampal pyruvate dehydrogenase activity.** *Free radical biology & medicine* 2006, **40**(11):1960-1970.
102. Bogaert YE, Sheu KF, Hof PR, Brown AM, Blass JP, Rosenthal RE, Fiskum G: **Neuronal subclass-selective loss of pyruvate dehydrogenase immunoreactivity following canine cardiac arrest and resuscitation.** *Experimental neurology* 2000, **161**(1):115-126.
103. Sun XR, Sun Z, Zhu Z, Guan HX, Li CY, Zhang JY, Zhang YN, Zhou H, Zhang HJ, Xu HM *et al*: **Expression of pyruvate dehydrogenase is an independent prognostic marker in gastric cancer.** *World journal of gastroenterology* 2015, **21**(17):5336-5344.

104. Zaidan E, Sims NR: **Reduced activity of the pyruvate dehydrogenase complex but not cytochrome c oxidase is associated with neuronal loss in the striatum following short-term forebrain ischemia.** *Brain research* 1997, **772**(1-2):23-28.
105. Bogaert YE, Rosenthal RE, Fiskum G: **Postischemic inhibition of cerebral cortex pyruvate dehydrogenase.** *Free radical biology & medicine* 1994, **16**(6):811-820.
106. Trojanowski T: **How intracranial aneurysm rupture damages the brain.** *Interventional neuroradiology : journal of peritherapeutic neuroradiology, surgical procedures and related neurosciences* 2008, **14 Suppl 1**:9-12.
107. Sun BL, Zheng CB, Yang MF, Yuan H, Zhang SM, Wang LX: **Dynamic alterations of cerebral pial microcirculation during experimental subarachnoid hemorrhage.** *Cellular and molecular neurobiology* 2009, **29**(2):235-241.
108. Siesjo BK: **Pathophysiology and treatment of focal cerebral ischemia. Part I: Pathophysiology.** *Journal of neurosurgery* 1992, **77**(2):169-184.
109. Sadrzadeh SM, Anderson DK, Panter SS, Hallaway PE, Eaton JW: **Hemoglobin potentiates central nervous system damage.** *The Journal of clinical investigation* 1987, **79**(2):662-664.
110. Wang X, Mori T, Sumii T, Lo EH: **Hemoglobin-induced cytotoxicity in rat cerebral cortical neurons: caspase activation and oxidative stress.** *Stroke; a journal of cerebral circulation* 2002, **33**(7):1882-1888.
111. Zaidan E, Sims NR: **Selective reductions in the activity of the pyruvate dehydrogenase complex in mitochondria isolated from brain subregions following forebrain ischemia in rats.** *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 1993, **13**(1):98-104.
112. Vereczki V, Martin E, Rosenthal RE, Hof PR, Hoffman GE, Fiskum G: **Normoxic resuscitation after cardiac arrest protects against hippocampal oxidative stress, metabolic dysfunction, and neuronal death.** *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 2006, **26**(6):821-835.
113. Metodiewa D, Koska C: **Reactive oxygen species and reactive nitrogen species: relevance to cyto(neuro)toxic events and neurologic disorders. An overview.** *Neurotoxicity research* 2000, **1**(3):197-233.
114. Liu Y, Rosenthal RE, Haywood Y, Miljkovic-Lolic M, Vanderhoek JY, Fiskum G: **Normoxic ventilation after cardiac arrest reduces oxidation of brain lipids and improves neurological outcome.** *Stroke; a journal of cerebral circulation* 1998, **29**(8):1679-1686.
115. Lai JC, DiLorenzo JC, Sheu KF: **Pyruvate dehydrogenase complex is inhibited in calcium-loaded cerebrocortical mitochondria.** *Neurochemical research* 1988, **13**(11):1043-1048.
116. Kruman, II, Mattson MP: **Pivotal role of mitochondrial calcium uptake in neural cell apoptosis and necrosis.** *Journal of neurochemistry* 1999, **72**(2):529-540.
117. Pandya JD, Nukala VN, Sullivan PG: **Concentration dependent effect of calcium on brain mitochondrial bioenergetics and oxidative stress parameters.** *Frontiers in neuroenergetics* 2013, **5**:10.
118. Sugi T, Fujishima M, Omae T: **Lactate and pyruvate concentrations, and acid-base balance of cerebrospinal fluid in experimentally induced intracerebral and subarachnoid hemorrhage in dogs.** *Stroke; a journal of cerebral circulation* 1975, **6**(6):715-719.
119. Carpenter DA, Grubb RL, Jr., Tempel LW, Powers WJ: **Cerebral oxygen metabolism after aneurysmal subarachnoid hemorrhage.** *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 1991, **11**(5):837-844.

120. Malinova V, Schatlo B, Voit M, Suntheim P, Rohde V, Mielke D: **Identification of specific age groups with a high risk for developing cerebral vasospasm after aneurysmal subarachnoid hemorrhage.** *Neurosurgical review* 2016.
121. Roos YB, de Haan RJ, Beenen LF, Groen RJ, Albrecht KW, Vermeulen M: **Complications and outcome in patients with aneurysmal subarachnoid haemorrhage: a prospective hospital based cohort study in the Netherlands.** *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry* 2000, **68**(3):337-341.
122. Cesarini KG, Enblad P, Ronne-Engstrom E, Marklund N, Salci K, Nilsson P, Hardemark HG, Hillered L, Persson L: **Early cerebral hyperglycolysis after subarachnoid haemorrhage correlates with favourable outcome.** *Acta neurochirurgica* 2002, **144**(11):1121-1131.
123. Sarrafzadeh A, Haux D, Plotkin M, Ludemann L, Amthauer H, Unterberg A: **Bedside microdialysis reflects dysfunction of cerebral energy metabolism in patients with aneurysmal subarachnoid hemorrhage as confirmed by 15 O-H2 O-PET and 18 F-FDG-PET.** *Journal of neuroradiology Journal de neuroradiologie* 2005, **32**(5):348-351.
124. Sarrafzadeh A, Haux D, Kuchler I, Lanksch WR, Unterberg AW: **Poor-grade aneurysmal subarachnoid hemorrhage: relationship of cerebral metabolism to outcome.** *Journal of neurosurgery* 2004, **100**(3):400-406.
125. Zetterling M, Hillered L, Enblad P, Karlsson T, Ronne-Engstrom E: **Relation between brain interstitial and systemic glucose concentrations after subarachnoid hemorrhage.** *Journal of neurosurgery* 2011, **115**(1):66-74.
126. Kalimo H, Rehncrona S, Soderfeldt B, Olsson Y, Siesjo BK: **Brain lactic acidosis and ischemic cell damage: 2. Histopathology.** *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 1981, **1**(3):313-327.
127. Chouchani ET, Pell VR, Gaude E, Aksentijevic D, Sundier SY, Robb EL, Logan A, Nadtochiy SM, Ord EN, Smith AC *et al*: **Ischaemic accumulation of succinate controls reperfusion injury through mitochondrial ROS.** *Nature* 2014, **515**(7527):431-435.
128. Nakagawa Y, Fujimoto N, Matsumoto K, Cervos-Navarro J: **Morphological changes in acute cerebral ischemia after occlusion and reperfusion in the rat.** *Advances in neurology* 1990, **52**:21-27.
129. Kumar VS, Gopalakrishnan A, Naziroglu M, Rajanikant GK: **Calcium ion--the key player in cerebral ischemia.** *Current medicinal chemistry* 2014, **21**(18):2065-2075.
130. Siesjo BK: **Calcium-mediated processes in neuronal degeneration.** *Annals of the New York Academy of Sciences* 1994, **747**:140-161.
131. Siesjo BK, Zhao Q, Pahlmark K, Siesjo P, Katsura K, Folbergrova J: **Glutamate, calcium, and free radicals as mediators of ischemic brain damage.** *The Annals of thoracic surgery* 1995, **59**(5):1316-1320.
132. Wan B, LaNoue KF, Cheung JY, Scaduto RC, Jr.: **Regulation of citric acid cycle by calcium.** *The Journal of biological chemistry* 1989, **264**(23):13430-13439.
133. Singh BK, Tripathi M, Pandey PK, Kakkar P: **Alteration in mitochondrial thiol enhances calcium ion dependent membrane permeability transition and dysfunction in vitro: a cross-talk between mtThiol, Ca(2+), and ROS.** *Molecular and cellular biochemistry* 2011, **357**(1-2):373-385.
134. Rehncrona S, Mela L, Siesjo BK: **Recovery of brain mitochondrial function in the rat after complete and incomplete cerebral ischemia.** *Stroke; a journal of cerebral circulation* 1979, **10**(4):437-446.
135. Persson L, Valtysson J, Enblad P, Warme PE, Cesarini K, Lewen A, Hillered L: **Neurochemical monitoring using intracerebral microdialysis in patients with subarachnoid hemorrhage.** *Journal of neurosurgery* 1996, **84**(4):606-616.

136. Vespa P, Bergsneider M, Hattori N, Wu HM, Huang SC, Martin NA, Glenn TC, McArthur DL, Hovda DA: **Metabolic crisis without brain ischemia is common after traumatic brain injury: a combined microdialysis and positron emission tomography study.** *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 2005, **25**(6):763-774.
137. Pulsinelli WA, Levy DE, Duffy TE: **Regional cerebral blood flow and glucose metabolism following transient forebrain ischemia.** *Annals of neurology* 1982, **11**(5):499-502.
138. Fiskum G, Danilov CA, Mehrabian Z, Bambrick LL, Kristian T, McKenna MC, Hopkins I, Richards EM, Rosenthal RE: **Postischemic oxidative stress promotes mitochondrial metabolic failure in neurons and astrocytes.** *Annals of the New York Academy of Sciences* 2008, **1147**:129-138.
139. Zaidan E, Sheu KF, Sims NR: **The pyruvate dehydrogenase complex is partially inactivated during early recirculation following short-term forebrain ischemia in rats.** *Journal of neurochemistry* 1998, **70**(1):233-241.
140. Rosenthal RE, Hamud F, Fiskum G, Varghese PJ, Sharpe S: **Cerebral ischemia and reperfusion: prevention of brain mitochondrial injury by lidoflazine.** *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 1987, **7**(6):752-758.
141. Fiskum G, Murphy AN, Beal MF: **Mitochondria in neurodegeneration: acute ischemia and chronic neurodegenerative diseases.** *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 1999, **19**(4):351-369.
142. Plesnila N, Ringel F, Chang RC, Staub F, Baethmann A: **Relevance of calcium homeostasis in glial cell swelling from acidosis.** *Acta neurochirurgica Supplement* 1998, **71**:203-205.
143. Fukuchi T, Katayama Y, Kamiya T, McKee A, Kashiwagi F, Terashi A: **The effect of duration of cerebral ischemia on brain pyruvate dehydrogenase activity, energy metabolites, and blood flow during reperfusion in gerbil brain.** *Brain research* 1998, **792**(1):59-65.
144. Schoder H, Knight RJ, Kofoed KF, Schelbert HR, Buxton DB: **Regulation of pyruvate dehydrogenase activity and glucose metabolism in post-ischaemic myocardium.** *Biochimica et biophysica acta* 1998, **1406**(1):62-72.
145. M. Barth AP, C. Thomé: **Grundlagen neurochirurgischer Intensivmedizin**, 2 edn: J. Piek, A. Unterberg; 2006.
146. Schubert GA, Seiz M, Hegewald AA, Manville J, Thome C: **Hypoperfusion in the acute phase of subarachnoid hemorrhage.** *Acta neurochirurgica Supplement* 2011, **110**(Pt 1):35-38.
147. Westermaier T, Stetter C, Raslan F, Vince GH, Ernestus RI: **Brain edema formation correlates with perfusion deficit during the first six hours after experimental subarachnoid hemorrhage in rats.** *Experimental & translational stroke medicine* 2012, **4**(1):8.
148. Petruk KC, Weir BK, Marriott MR, Overton TR: **Clinical grade, regional cerebral blood flow and angiographical spasm in the monkey after subarachnoid and subdural hemorrhage.** *Stroke; a journal of cerebral circulation* 1973, **4**(3):431-445.
149. Frolich L, Gotz ME, Weinmuller M, Youdim MB, Barth N, Dirr A, Gsell W, Jellinger K, Beckmann H, Riederer P: **(r)-, but not (s)-alpha lipoic acid stimulates deficient brain pyruvate dehydrogenase complex in vascular dementia, but not in Alzheimer dementia.** *J Neural Transm* 2004, **111**(3):295-310.

150. Panigrahi M, Sadguna Y, Shivakumar BR, Kolluri SV, Roy S, Packer L, Ravindranath V: **alpha-Lipoic acid protects against reperfusion injury following cerebral ischemia in rats.** *Brain research* 1996, **717**(1-2):184-188.
151. Deng H, Zuo X, Zhang J, Liu X, Liu L, Xu Q, Wu Z, Ji A: **alpha-lipoic acid protects against cerebral ischemia/reperfusion-induced injury in rats.** *Molecular medicine reports* 2015, **11**(5):3659-3665.
152. Nicklas WJ, Clark JB, Williamson JR: **Metabolism of rat brain mitochondria. Studies on the potassium ion-stimulated oxidation of pyruvate.** *The Biochemical journal* 1971, **123**(1):83-95.
153. Gelmers HJ, Gorter K, de Weerd CJ, Wiezer HJ: **A controlled trial of nimodipine in acute ischemic stroke.** *The New England journal of medicine* 1988, **318**(4):203-207.
154. Berger L, Hakim AM: **Nimodipine prevents hyperglycemia-induced cerebral acidosis in middle cerebral artery occluded rats.** *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 1989, **9**(1):58-64.
155. Nunez-Figueroa Y, Ramirez-Sanchez J, Hansel G, Simoes Pires EN, Merino N, Valdes O, Delgado-Hernandez R, Parra AL, Ochoa-Rodriguez E, Verdecia-Reyes Y *et al*: **A novel multi-target ligand (JM-20) protects mitochondrial integrity, inhibits brain excitatory amino acid release and reduces cerebral ischemia injury in vitro and in vivo.** *Neuropharmacology* 2014, **85**:517-527.
156. Martinez-Vila E, Guillen F, Villanueva JA, Matias-Guiu J, Bigorra J, Gil P, Carbonell A, Martinez-Lage JM: **Placebo-controlled trial of nimodipine in the treatment of acute ischemic cerebral infarction.** *Stroke; a journal of cerebral circulation* 1990, **21**(7):1023-1028.
157. Dimlich RV, Nielsen MM: **Facilitating postischemic reduction of cerebral lactate in rats.** *Stroke; a journal of cerebral circulation* 1992, **23**(8):1145-1152; discussion 1152-1143.
158. Corbett R, Laptook A, Gee J, Garcia D, Silmon S, Tollefsbol G: **Age-related differences in the effect of dichloroacetate on postischemic lactate and acid clearance measured in vivo using magnetic resonance spectroscopy and microdialysis.** *Journal of neurochemistry* 1998, **71**(3):1205-1214.
159. Graham GD, Barker PB, Brooks WM, Morris DC, Ahmed W, Bryniarski E, Hearshen DO, Sanders JA, Holshouser BA, Turkel CC: **MR spectroscopy study of dichloroacetate treatment after ischemic stroke.** *Neurology* 2000, **55**(9):1376-1378.
160. Rosenthal RE, Williams R, Bogaert YE, Getson PR, Fiskum G: **Prevention of postischemic canine neurological injury through potentiation of brain energy metabolism by acetyl-L-carnitine.** *Stroke; a journal of cerebral circulation* 1992, **23**(9):1312-1317; discussion 1317-1318.
161. Di Lisa F, Menabo R, Siliprandi N: **L-propionyl-carnitine protection of mitochondria in ischemic rat hearts.** *Molecular and cellular biochemistry* 1989, **88**(1-2):169-173.

## 6.2 Eigene Veröffentlichungen

### Paper

Lilla N, Füllgraf H, Stetter C, Köhler S, Ernestus RI, Westermaier T.  
First Description of Reduced Pyruvate Dehydrogenase Enzyme Activity Following Subarachnoid Hemorrhage (SAH). Front Neurosci. 2017 Feb 14;11:37.

### Abstracts

2015

Willner N, Füllgraf H, Ernestus R-I, Westermaier T

Pyruvate dehydrogenase-enzyme activity is reduced in experimental subarachnoid hemorrhage strongly suggesting a derangement of oxidative metabolism

5. Joint meeting der Brasilianischen (SBN) und Deutschen Gesellschaft für Neurochirurgie (DGNC) in Sao Paulo, Brasilien (2014)

2014

Willner N, Füllgraf H, Köhler S, Stetter C, Ernestus RI, Westermaier

Metabolic changes in the early phase of experimental subarachnoid hemorrhage: reduction of pyruvate dehydrogenase enzyme indicates derangement of oxidative metabolism

Annual Meeting of the section intracranial pressure of the german society of neurosurgery in München, Germany (2014)

2014

Willner N, Füllgraf H, Köhler S, Stetter C, Ernestus RI, Westermaier T

Aktivität des Enzyms Pyruvatdehydrogenase in Hemisphäre und Hippocampus in experimenteller Subarachnoidalblutung: Reduktion legt stark eine Störung des oxydativen Stoffwechsels nahe

65. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Neurochirurgie (DGNC) in Dresden, Deutschland (2014)

### 6.3 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematisch - Hirnhäute mit subarachnoidalem Blut .....	1
Abbildung 2 Hunt/Hess-Skala .....	4
Abbildung 3 Fisher-Skala .....	5
Abbildung 4: Überblick über die Reaktionskette nach SAB.....	6
Abbildung 5: Frühphase und Sekundärphase der SAB. ....	7
Abbildung 6: Gewebesauerstoffkonzentration (ptiO <sub>2</sub> ) in % vom Ausgangswert.....	9
Abbildung 7: Oxidative Carboxylierung von 1 Mol Pyruvat .....	12
Abbildung 8: Schematische Darstellung der Reaktion des Pyruvatedehydrogenase ....	27
Abbildung 9: Arterieller Mitteldruck (MABP).....	29
Abbildung 10: Intrakranieller Druck (ICP).....	31
Abbildung 11: Zerebraler Perfusionsdruck (CPP) .....	32
Abbildung 12: Hirndurchblutung (LCBF) der rechten Hemisphäre .....	33
Abbildung 13: Hirndurchblutung (LCBF) der linken Hemisphäre .....	34
Abbildung 14: Vorderer Hippocampus.....	35
Abbildung 15: PDHC Immunhistochemie histologische Bilder.....	36
Abbildung 16: PDHC Immunhistochemie Auswertung.....	38
Abbildung 17: Messung der PDHC-Aktivität via ELISA-Reader.....	39
Abbildung 18: Schematische Darstellung des Citratzyklus mit Veränderungen nach einer SAB.....	47

## Abkürzungsverzeichnis

A.	Arteria
Aa.	Arteriae
Abs.	Absatz
ABC-Komplex	Avitin-Biotin-Peroxidase-Komplexmethode
ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosinriphosphat
Ca <sup>2+</sup>	Calcium
CPP	zerebraler Perfusionsdruck
CMRO <sub>2</sub>	Sauerstoff-Stoffwechselrate
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DEPC	Diethylpyrocarbonate
Dest.	destillata
EtOH	Ethanol
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FiO <sub>2</sub>	inspiratorische Sauerstofffration
H <sup>+</sup>	Wasserstoffion
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
ICP	intrazerebraler Druck
LCBF	lokale zerebrale Durchblutung

Lsg.	Lösung
MABP	mean arterial blood pressure; arterieller Mitteldruck
M.	Musculus
mmHg	Millimeter Quecksilber
NAD <sup>+</sup>	Nicotinamidadenindinukleotid
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PDHC	Pyruvatdehydrogenasekomplex
PDP-1, -2	Pyruvatdehydrogenase-Phosphatasen-1, 2
pH	pH-Wert
Rpm	Rounds per minute
RT	Raumtemperatur
SAB	Subarachnoidalblutung
TPP	Thiaminpyrophosphat
Vs.	versus
°C	Grad Celsius

## **Danksagung**

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. Thomas Westermaier dafür, dass er mir dieses Thema zur Ausarbeitung einer Promotionsarbeit überlassen hat. Zudem möchte ich ihm herzlich für die allzeit freundliche und umfassende Unterstützung und Hilfe in wissenschaftlichen Fragen danken.

Des Weiteren danke ich der Betreuerin meiner Promotionsarbeit, Frau Dr. med. Nadine Lilla herzlich, ihr und Herrn Prof. Dr. med. Thomas Westermaier verdanke ich die während der Zeit der Promotionsarbeit gewonnenen experimentellen Fähigkeiten sowie das Erlernen wissenschaftlicher Recherche und Erstellung wissenschaftlicher Texte.

Zudem danke ich besonders meinen Eltern und meiner Schwester sowie auch meinen lieben Freunden ohne die mein Studium nicht realisierbar gewesen wäre, geschweige denn die Durchführung meiner Promotionsarbeit.

Gerne möchte ich mich auch bei Herrn Dr. med. Herbert Baar für seine Unterstützung bedanken.

Vor allem möchte ich mich bei meinem Freund, Wolfgang Baar, bedanken. Seiner Motivation verdanke ich es, dass ich es geschafft habe, eine experimentelle Arbeit fertig zu stellen. Seine Unterstützung vor allem während der schwierigeren oder frustrierten Phasen der Promotionsarbeit war stetig eine große Hilfe.