

Aus Neurochirurgische Klinik und Poliklinik
der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Neuroprotektive Effekte des Edelgases Argon bei der experimentellen
Subarachnoidalblutung im Rattenmodell

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der
Medizin
der Universitätsmedizin
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Vorgelegt von

Anika Anita Elisabeth Korinek
aus Schwetzingen

Mainz, 2020

Wissenschaftlicher Vorstand:

Tag der Promotion:

Univ.-Prof. Dr. U. Förstermann

07. Dezember 2021

Für meinen geliebten Großvater
Friedhelm Heynen

Inhaltsverzeichnis

1. Einführung	1
1.1. Die Subarachnoidalblutung	1
1.1.1. Ursachen und Risiken für eine SAB.....	1
1.1.2. Diagnosestellung einer SAB	1
1.1.3. Komplikationen und Folgen der SAB.....	3
1.1.3.1. Vasospasmus.....	5
1.1.4. Therapie einer SAB	6
1.1.4.1. Clipping.....	6
1.1.4.2. Coiling.....	7
1.1.4.3. Coiling und Clipping im Vergleich.....	8
1.1.4.4. Hirndruckmanagement.....	8
1.1.4.5. Blutdruckmanagement	12
1.1.4.6. Therapie des Vasospasmus.....	13
1.2. Neuroprotektion.....	13
1.2.1. Neuroprotektive Ansätze von Edelgasen.....	14
1.2.1.1. Das Edelgas Argon	15
2. Zielsetzung	18
3. Materialien und Methoden	19
3.1. Versuchstiere und Tierhaltung	19
3.2. Versuchsgruppen	19
3.3. Das Tiermodell der SAB.....	19
3.3.1. Manuelle Provokation einer SAB	20
3.4. Versuchsvorbereitung	20
3.4.1. Wiegen und Narkose	20
3.4.2. Rasur und Fixation.....	21
3.4.3. Laserdoppler - Flowmetrie	21
3.4.4. Anlage der arteriellen Blutdrucksonde	22
3.4.4.1. Physikalische Grundlagen der Blutdruckrelevanz.....	22
3.4.5. Blutgasanalyse	23
3.5. Präparation und Versuchsdurchführung.....	23
3.6. Klinisch-neurologische Testung der Versuchstiere	26
3.7. Gewebeuntersuchung	27
3.7.1. Pufferapplikation	28
3.7.2. Entnahme des Gehirns	29

3.7.3. Neuropathologische Begutachtung.....	29
3.7.3.1. Gefäßmorphologie der Aa. basilares.....	29
3.7.3.2. Gliafibrilläres saures Protein (GFAP)	30
3.7.3.3. Ionisierendes Calcium-bindendes Adaptermolekül (Iba1).....	30
4. Ergebnisse.....	31
5. Diskussion	44
6. Zusammenfassung	53
7. Literaturverzeichnis.....	54

Abkürzungsverzeichnis

A. bzw. Aa	Arteria bzw. Arteriae (Arterie bzw. Arterien)	S. 5
ACA	Arteria cerebri anterior	S. 25
ACI	Arteria carotis interna	S. 7
AKT	Protein Kinase B (Serin/Threonin Kinase)	S. 17
AMPA	Alpha-Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-4-Isoxazolepropionic Acid (Rezeptor)	S. 15
BAX	bcl-2- Familie, proapoptotisch	S. 17
BCL-2	bcl-2- Familie, antiapoptotisch	S. 17
BCL-X	bcl-2- Familie, anitapoptotisch	S. 17
CBF	Zerebraler Blutfluss	S. 4
CCA	Arteria carotis communis	S. 23
CPP	Zerebraler Perfusionsdruck	S. 22
CT	Computertomografie	S. 1
CTA	Computertomografische Angiografie	S. 5
DGN	Deutsche Gesellschaft für Neurologie	S. 3
DNA	Desoxyribonukleinsäure	S. 37
DSA	Digitale Subtraktionsangiographie	S. 5
ECA	Arteria carotis externa	S. 23
EEG	Elektroenzephalogramm	S. 10
EKG	Elektrokardiogramm	S. 6
ERK	Extracellular-Signal Regulated Kinase	S. 16
EVD	Externe Ventrikeldrainage	S. 9
EVP	Endovaskulären Perforationsmodell	S. 20
GCS	Glasgow Coma Scale	S. 2
GFAP	Gliafibrilläres saures Protein	S. 29
HE	Hämatoxylin-Eosin	S. 29
HIF-1 α	Hypoxie-induzierter Faktor 1 alpha	S. 16
HO-1	Hämoxygenase 1	S. 16
HSP	Hitzeschockprotein	S. 17
HTS	Hyperosmolare Substanzen	S. 10
Iba1	Ionisierendes Calcium-bindendes Adaptermolekül	S. 29
ICA	Arteria cerebri interna	S. 5

ICB	Intracerebral/parenchymal Bleeding (intrakranielle/-parenchymale Blutung)	S. 31
ICG	Indocyaningrün	S. 7
ICP	Intracranial pressure (intrakranieller Druck)	S. 4
IFIII	Intermediäres Filament	S. 30
IRAK4	Interleukin-1 receptor-associated kinase 4 (Signalprotein)	S. 17
IVH/IVB	Intraventrikular Haemorrhage/Intraventrikuläre Blutung	S. 31
JNK	C-Jun N-Terminale Kinasen	S. 17
MAP	Mittlerer arterieller Blutdruck	S. 22
MCA	Arteria cerebri media	S. 5
MKK	MAP kinase kinase	S. 17
MRT	Magnetresonanztomografie	S. 1
mTOR	Mechanistic target of Rapamycin (Serin/Threonin-Kinase)	S. 17
MyD88	Myeloid differentiation primary response 88 (Signalprotein)	S. 17
N.	Nervus (Nerv)	S. 23
NaCl	Natriumchlorid	S. 23
NF- κ B	Nuclear Factor `kappa-light-chain-enhancer` of activated B-cells (Transkriptionsfaktor)	S. 16
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat (Rezeptor)	S. 15
Nrf2	E2-related factor 2 (Transkriptionsfaktor)	S. 17
PaCO ₂	Kohlendioxidpartialdruck	S. 9
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase (Enzym zur Signaltransduktion)	S. 17
p38	Mitogenaktivierte Proteinkinase	S. 17
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies; „Sauerstoffradikale“	S. 17
SAB	Subarachnoidalblutung	S. 1
SEM	Standartfehler	S. 40
Sham	„Schein-“; Kontroll(tier)	S. 19
STAT3	Signal transducer and activator of transcription 3 (Transkriptionsfaktor)	S. 17
TLR	Toll-like-Rezeptor	S. 15
TRIF	TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β (Adaptermolekül)	S. 17
TschG	Tierschutzgesetz	S. 19
WFNS	World Federation of Neurosurgical Societies	S. 1

Abbildungs-, Diagramm- und Tabellenverzeichnis

Abb. 1.	Die molekularer Beeinflussung von Argon im intrazellulären Apoptose- Signalweg	S. 17
Abb. 2.	Fixierung der Versuchstiere zur Laserdoppleranlage	S. 21
Abb. 3.	Eine mikroskopische intraoperative Darstellung der Bifurkation der rechten CCA	S. 24
Abb. 4.	Schema zur Perforation an der Bifurkation von ACA und MCA	S. 25
Abb. 5.	Ventilation des Argon-/Sauerstoffgemisches	S. 26
Abb. 6.	Makroskopischer Grad der SAB	S. 32
Abb. 7.	Fokale Ischämie in der Gruppe SAB + Argon	S. 39
Abb. 8.	Exprimierung von GFAP in den mit Argon ventilierten Gruppen	S. 40
Abb. 9.	Exprimierung von Iba1 in den mit Argon ventilierten Gruppen	S. 40
Abb. 10.	Abbildung Basilararteriendurchmesser	S. 41
Abb. 11.	Abbildung Basilararterienwanddicke	S. 41
Abb. 12.	Abbildung Gefäßdurchflussfläche	S. 41
Dia. 1.	Vorgehen bei erhöhtem intrakraniellm Druck oder Herniation	S. 11
Dia. 2.	24-Stunden-Überleben und Mortalitätsrate in %	S. 33
Dia. 3.	Der regionale zerebrale Blutfluss aller Gruppen im Zeitverlauf	S. 34
Dia. 4.	Der mittlere art. Blutdruck im Vergleich der einzelnen Gruppen im Verlauf	S. 34
Dia. 5.	Ergebnisse der Laserdopplermessungen bei SAB-Provokation/ bei ausbleibender SAB in den einzelnen Gruppen	S. 35
Dia. 6.	Ergebnisse der Laserdopplermessungen während der Argon-Ventilation in den einzelnen Gruppen	S. 35
Dia. 7.	Ergebnisse der art. Blutdruckmessungen kurz nach SAB-Provokation/ ausbleibender SAB bis Argon-Ventilation in den einzelnen Gruppen	S. 36
Dia 8.	Ergebnisse art. Blutdruckmessungen während der Argon-Ventilation in den einzelnen Gruppen	S. 36
Dia 9.	Postoperative Mittelwerte im Neuroscore	S. 42

Tab. 1.	Einteilung der Klinik einer SAB nach Hunt und Hess und nach der WFNS	S. 2
Tab. 2.	Einteilung des neurologischen Status bei Vigilanzminderung nach GCS	S. 2
Tab. 3.	Bildmorphologische Einteilung der SAB nach Fisher	S. 3
Tab. 4.	Verteilung der Versuchstiere nach Art der intrakraniellen Blutung	S. 32
Tab. 5.	Verteilung nach Ausmaß des Blutungsgeschehens	S. 32
Tab. 6.	Auswertung regionaler zerebrale Perfusion im zeitlichen Vergleich	S. 33
Tab. 7.	Auswertung des mittleren arteriellen Blutdruck im zeitlichen Vergleich	S. 34
Tab. 8.	Auswertung des rCRB und arteriellen Blutdrucks in den einzelnen Gruppen	S. 37
Tab. 9.	Auswertung der Ergebnisse der Gefäßdurchmesser/ - wanddicke/ und - durchflussfläche in Gegenüberstellung der einzelnen Gruppen	S. 42
Tab. 10.	Statistische Auswertung des postoperativen Neuroscores	S. 43

1. Einführung

1.1. Die Subarachnoidalblutung

Eine Subarachnoidalblutung (SAB) beschreibt eine Blutung in den kraniellen und/oder spinalen Liquorraum und kann nach ihrer Genese eingeteilt werden in ein traumatisches oder spontanes Geschehen (1).

1.1.1. Ursachen und Risiken für eine SAB

Ein Hypertonus, Rauchen und starker Alkoholkonsum konnten in Studien für verschiedene Länder als unabhängiger Risikofaktoren für eine SAB eruiert werden (2, 3). Des Weiteren zählen laut Korja et al das weibliche Geschlecht, frühere Myokardinfarkte, eine Vorgeschichte vorzeitiger Schlaganfälle bei der Mutter und erhöhte Cholesterinwerte bei Männern zu weiteren Risikofaktoren für eine SAB (4). Ca. 80 % der spontanen SAB sind Folge einer Ruptur eines intrakraniellen arteriellen Aneurysmas (5). Somit ist der Schwerpunkt der nachfolgenden Ausarbeitung auf diese Genese gewählt.

1.1.2. Diagnosestellung einer SAB

Der klinische Verdacht für eine akute SAB erfolgt aufgrund plötzlich einsetzender stärkster Kopfschmerzen und geht meist parallel mit Nackenschmerzen, Übelkeit und Erbrechen, einer Photophobie bis hin zur Bewusstlosigkeit einher. Schätzungsweise stirbt mindestens eine von acht Personen, bevor das Krankenhaus erreicht werden kann und betrifft eher die jüngere Population im Vergleich zu einer intrazerebralen Hämorrhagie oder einem ischämischem Schlaganfall (6, 7). Innerhalb von 12 Stunden nach Beginn einer Blutung trägt eine computertomographische Aufnahme des Schädels mit einer Sensitivität von 98% zur Erkennung einer SAB bei (8). Zeigt trotz dringendem Verdacht auf eine SAB das CT keine Zeichen für eine Blutung und ist eine Bildgebung mittels MRT nicht sofort verfügbar, ist eine Lumbalpunktion indiziert. Diese gilt ca. 6 bis 12 Stunden nach SAB am sensitivsten für den Nachweis von Blut im Subarachnoidalraum. Sogenannte Siderophagen, die sich mit der Zeit im Liquor bilden, sind dabei sogar noch Monate nach Blutungsereignis im Liquor nachweisbar (9).

Der Schweregrad einer SAB kann unter anderem anhand der Klinik nach Hunt und Hess und/oder World Federation of Neurosurgical Societies (WFNS) eingeteilt werden. Zweitens orientiert sich neben dem Auftritt neurologischer Defizite besonders an der sogenannten Glasgow Coma Scale (GCS) (10).

Eine weitere mögliche Einteilung ist nach bildmorphologischem Blutungsausmaß anhand der Fisher-Klassifikation möglich (11).

Grad	Hunt und Hess	WFNS
1	Asymptomatisch oder minimale Kopfschmerzen und leichter Meningismus	GCS 15 ohne fokales Defizit
2	Mäßige bis starke Kopfschmerzen, Meningismus, mögliche Hirnnervenausfälle, keine weiteren neurologischen Ausfälle	GCS 13-14 ohne fokales Defizit
3	Somnolenz und/oder Verwirrtheit und/oder leichte fokal-neurologische Ausfälle	GCS 13-14 mit fokalem Defizit
4	Sopor,mäßige bis schwere fokal-neurologische Ausfälle, vegetative Störungen	GCS 7-12 mit/ohne fokales Defizit
5	Koma, Zeichen der Einklemmung	GCS 3-6 mit/ohne fokales Defizit

Tab. 1. Einteilung der Klinik einer SAB nach Hunt und Hess und nach der WFNS (10)

Punkte	Augenöffnen	Verbale Reaktion	Motorische Reaktion
6			Aufforderungen werden befolgt
5		Orientiert und konversationsfähig	Reaktion gezielt auf Schmerzreiz
4	spontan	Desorientiert, aber konversationsfähig	Reaktion ungezielt auf Schmerzreiz
3	Bei Aufforderung	Unzusammenhängende Wörter	Reaktion mit Beugesynergismen auf Schmerzreiz
2	Bei Schmerzreiz	Unverständliche Laute	Reaktion mit Strecksynergismen auf Schmerzreiz
1	Keine Reaktion	Keine Reaktion	Keine Reaktion

Tab. 2. Einteilung des neurologischen Status bei Vigilanzminderung nach GCS

Grad	Bildmorphologie
1	Kein Blut sichtbar
2	Diffuse Ablagerung oder dünne Schicht mit allen vertikalen Blutschichten (interhemisphärische Fissur, Inselzisterne, Umgebungszisterne) < 1 mm dick
3	Lokalisierte Gerinnsel und / oder vertikale Blutschichten mit einer Dicke von ≥ 1 mm
4	Diffuses oder kein subarachnoidales Blut, jedoch mit intrazerebralen oder intraventrikulären Gerinnseln

Tab. 3. Bildmorphologische Einteilung der SAB nach Fisher (11)

Insgesamt zeigt die GCS als alleinige Einteilung die stärkste Korrelation der in der Klinik genutzten Skalen des Schweregrads in Bezug auf die Lebensqualität auf (12). Eine Risikoabschätzung ist dennoch auch nach den anderen Skalen möglich, beispielsweise zeigen Patienten mit einem hohen Ausgangsgrad nach WFNS ein höheres Risiko für frühe Hirnverletzungen, verzögerte zerebrale Ischämie und systemische Komplikationen (13).

1.1.3. Komplikationen und Folgen der SAB

Die SAB ist ein medizinischer Notfall und geht mit einer erheblichen Morbidität und Mortalität einher (14). Im Allgemeinen gilt, dass ein höheres Alter, ein schlechter WFNS-Grad bei klinischer Vorstellung, ein längeres Zeitintervall zwischen Präsentation und Diagnose und das Ausbleiben einer Aneurysma-Behandlung signifikant mit einem schlechten klinischen Outcome verbunden werden können (15). Laut der Leitlinien der Deutsche Gesellschaft für Neurologie (DGN) ist die Letalität der aneurysmatischen SAB in den letzten Jahrzehnten zwar gesunken, die Inzidenz jedoch nicht (1). Selbst nach stattgehabter bzw. laufender Therapie in einem Krankenhaus ist die Mortalität einer solchen Blutung hoch. Beeinflusst wird diese besonders von dem Ausmaß des primären neurologischen Defizits, eingeteilt, wie bereits genannt, nach Hunt und Hess (10).

Die mit der SAB assoziierten Komplikationen bei Patienten lassen sich zeitlich in drei Phasen einteilen:

Akut stehen im Vordergrund zum einen die Gefahr der Rezidivblutung (bspw. aus einem Aneurysma) und das Aufkommen eines erhöhten Hirndrucks. Durch die SAB kommt es zu einem Übergang von Blutvolumen in den räumlich begrenzten Subarachnoidalraum. Bleibt ein Sistieren der Blutung aus oder kommt es zu einer Liquorzirkulationsstörung mit konsekutivem Hydrocephalus, kann eine darauffolgende rapide Zunahme des intrazerebralen Drucks (ICP) zu einer Einklemmung und Hypoperfusion des Hirngewebes führen (16). In diesem Fall ist auch das Auftreten eines sogenannten Terson-Syndroms möglich, eine Glaskörperblutung infolge einer venösen Stase, die mit der Gefahr einer Erblindung einhergeht und in bis zu 8 - 14,5% der SABs zu finden ist (17). Zusätzlich kann durch Aktivierung des sympathischen Nervensystems eine akute kardiopulmonale Instabilität auftreten, die ebenso mit intrakranieller Hypertonie und/oder einer beeinträchtigten zerebralen Durchblutung (CBF) einher gehen kann (13). Diese inadäquate Perfusion des Hirngewebes führt im schlimmsten Fall zu einem ischämischen Untergang des nachgeschalteten neuronalen Gewebes. Je nach Größe des betroffenen Hirnareals führt diese Pathologie erneut zu einer intrakraniellen Hypertonie. Insgesamt sieht man die frühe Hirnverletzung am ehesten als Resultat einer Kombination aus Einschränkung der Mikrozirkulation durch unter anderem Mikrothrombosen, Störungen der Blut-Hirn-Schranke, zytotoxisch und vasogen hervorgerufene Hirnödeme, sowie neuronale und endotheliale Zellverletzungen an (13, 18).

Subakut lassen sich in manchen Fällen Vasospasmen oder die Entwicklung eines Hirnödems (das selbst wiederum zu einem erhöhten ICP führen kann) nachweisen (16). Dabei wird angenommen, dass die verzögerte Ischämie aufgrund eines Zusammenspiels zwischen genannten angiographischen Vasospasmen, Konstriktionen kleinerer Arteriolen und Thrombosebildung zustande kommt und so eine kortikale Verteilungsischämie zur Folge hat (19, 20). Zusätzlich ist auf allgemeine medizinische Komplikationen (bspw. Tödliche Arrhythmien, Multiorganversagen, Lungenembolien) zu achten.

In der chronischen Phase besteht die Gefahr des Auftritts des chronischen Hydrocephalus malresorptivus mit konsekutiver Hirndrucksymptomatik und allgemeinen kognitiven Störungen (16). Klinisch zeigen Patienten, die eine SAB überleben im Allgemeinen zudem häufig Defizite in Gedächtnis, Exekutivfunktion und

Sprache. Diese kognitiven Beeinträchtigungen beeinflussen Aktivitäten des täglichen Lebens, erschweren die Rückkehr zum Arbeitswesen und gehen mit Einbußen der Lebensqualität einher. Zusätzlich drohen Depressionen, Angstzustände, Müdigkeit und Schlafstörungen. Die Ursache neuronaler Schäden wie auch der primären Todesursache sind in den meisten Fällen direkte Auswirkungen der Blutung selbst (13, 14, 16, 21).

1.1.3.1. Vasospasmus

Neben der frühen Hirnschädigung, trägt das Phänomen des Vasospasmus als weiterer entscheidender Faktor zu der signifikanten Mortalität und Morbidität der SAB bei (22, 23).

Definitionsgemäß ist dieser eine angiographisch darstellbare (z.B. mittels CTA oder DSA) Verengung des Lumens einer oder mehrerer intrakranieller Hauptarterien nahe der Schädelbasis. Nachzuweisen ist er neben einer Computertomographie-Perfusion außerdem über eine transkranielle dopplersonografische Flussmessung der A. cerebri media. Hierbei ist das Hauptkriterium ein deutlicher Anstieg der Blutflussgeschwindigkeit und kann bei nicht eindeutigen Ergebnissen durch den so genannten Lindegaard Index (MCA / ICA) von einer zerebralen Hyperperfusion unterschieden werden (24, 25).

Der Vasospasmus kann sowohl aufgrund einer Kontraktion der glatten Muskulatur der Arterienwand als auch einer morphologischen Veränderung entlang der Endothelfläche als Reaktion auf eine Gefäßverletzung auftreten. Darüber hinaus kann er als verzögerter Beginn eines neurologischen Defizits nach stattgehabter SAB aufgefasst werden, von dem angenommen wird, dass er auf ein ischämisches Geschehen oder einen Teilinfarkt des Gehirns zurückzuführen ist. Eine dritte Definitionsvariante wäre eine Kombination beider genannter Ansätze (sog. symptomatischer Vasospasmus) (26).

Ein Vasospasmus tritt gewöhnlich am dritten Tag nach der subarachnoidalen Blutung auf und erfährt seinen Höhepunkt meist zwischen dem sechsten und achten Tag. Andauern kann er bis zu zwei bis drei Wochen. In besonders ausgeprägter Form kann es zu einem Hirninfarkt führen und durch Hypoperfusion die Apoptose nachgeschalteter Neuronen verursachen (26). Insgesamt ist der Pathomechanismus

noch nicht vollständig geklärt, wird allerdings von vielen Mechanismen beeinflusst, wie beispielsweise einer Reihe von Peptidhormonen wie dem Endothelin (27).

1.1.4. Therapie einer SAB

Die stationäre Therapie beginnt mit einem Basismonitoring der Vitalparameter (EKG, Pulsoxymetrie, kontinuierliche Blutdruckkontrolle), bedarfsgerechte Schmerztherapie und je nach Bewusstseinszustand die Sicherung der Atemwege. Es folgen unter intensivmedizinischer Überwachung ausreichende Bettruhe, Elektrolytstabilisierung und bei Bedarf eine antiepileptische Therapie (6).

Da während einer SAB die Verteilung von Blut im Subarachnoidalraum und häufig auch in das Gehirnparenchym und in die Ventrikel mit einem plötzlichen ICP-Anstieg verbunden sein kann, sollte sich das anfängliche Monitoring auf die Verhinderung einer neuen Blutung und Kontrolle des ICP konzentrieren (13).

Nach radiologischer Darstellung eines Aneurysmas als Blutungsquelle wird dieses mittels Clipping oder Coiling (s. u.) schnellstmöglich versorgt. Die American Heart Association / American Stroke Association gibt als Empfehlung (Klasse IB) heraus, eine endovaskuläre oder chirurgische Sanierung eines zerebralen Aneurysmas so früh wie möglich durchzuführen, um das Risiko einer erneuten aneurysmatischen Blutung nach SAB zu vermindern (7). Nach Möglichkeit sollte das nach den Richtlinien der Europäischen Schlaganfallorganisation zur Behandlung von intrakraniellen Aneurysmen und Subarachnoidalblutungen innerhalb von 72 Stunden nach Auftreten der ersten Symptome geschehen (28).

1.1.4.1. Clipping

Bei einem Clipping eines Aneurysmas handelt es sich um ein mikrochirurgisches Verfahren am offenen Hirn. Je nach Lage des Aneurysmas variiert der Zugangsweg und ist in manchen Fällen mikrochirurgisch gar nicht erst möglich.

Der Patient wird auf den Rücken gelagert und der Kopf in einer Mayfield-Klemme fixiert. Befindet sich das Aneurysma auf Ebene der Schädelbasis, im Besonderen im dorsalen Stromgebiet des Circulus arteriosus cerebri (willisii) wird der Kopf leicht nach hinten geneigt und um 30° auf die linke (nicht dominante) Seite gedreht. Nach Kopfrasur, sterilem Abwaschen und Sterilem Abdecken erfolgt ein bogenförmiger Hautschnitt frontobasolateral entlang des Haaransatzes mit anschließender

Präparation des Schädelknochens. Es erfolgt eine rechtsseitige pterionale Kraniotomie mit nach Bedarf teilweiser Abtragung des Keilbeinflügels. Nach Eröffnen der Dura wird mikroskopisch die Sylvische Fissur aufgesucht und in dieser in die Tiefe zur Schädelbasis präpariert. Der rechte Sehnerv, die rechte A. carotis interna (ACI) und der N. oculomotorius werden dargestellt. In diesem Blickwinkel ist oftmals der Hirnstamm in der Tiefe zu erkennen mit der ventral verlaufenden A. basilaris und deren terminalen Aufzweigungen. Es erfolgt nach zuvor bildmorphologischer Orientierung das Auffinden des Aneurysmas und dessen vorsichtige Freipräparation. Danach wird dieses an der Basis mit einem Clip versehen, um das Lumen der Gefäßaussackung auszuschalten. Um zu prüfen, ob nach dem Setzen des Clips eine Einschränkung der Durchblutung und/oder des Strömungsprofil vor- und nachgeschalteter Gefäße vorliegt kann seitens der Anästhesie ein Fluoreszenzfarbstoff, das Indocyaningrün (ICG) intravenös appliziert werden. Es werden die nächsten 90 Sekunden durch das OP-Mikroskop aufgezeichnet, das nahe im Infrarotbereich detektiert. Sollte Einschränkungen der besagten Perfusion auftreten wird die Position des Clips verändert mit anschließend erneuter Kontrolle (101). In manchen Fällen wird intraoperativ ein vorläufiges Clipping durchgeführt um das Aneurysma besser präparieren zu können und Stenosen der zuführenden Arterie zu vermeiden. Da dies mit einem Risiko einer intraoperativen Ruptur des Aneurysmas einhergeht wird individuell entschieden ob diese Technik angewandt wird (29). Es erfolgt das Verschließen des OP-Feldes und eine Kontroll-CTA im Verlauf.

1.1.4.2. Coiling

Das Coiling ist mittlerweile zur Standardbehandlung bei der aneurysmatischen SAB geworden. Nach van Dijk et al wird im Besonderen auch für Aneurysmen der A. cerebri media anterior (MCA), die selbst für Operationen sehr gut zugänglich sind, das Coiling empfohlen (30). Für diese Maßnahme wird nach Seldinger Technik ein Zugang (meist 6 oder 7 Charrière bei interventionellen Verfahren; 1 Charrière entspricht 1/3 mm) über die A. radialis oder A. femoralis punktiert (31, 32). Über diesen wird ein Mikrokatheter eingeführt, der eine entwundene Platinspirale in sich trägt und einen Führungsdraht aufsitzen hat. Der Katheter wird über die zuführenden Gefäße zum Aneurysma geleitet und kurz davor platziert. Unter ständiger angiografischer Kontrolle wird dann durch Verschieben die Platinspirale innerhalb

des Aneurysmas eingesetzt, die dann durch materialbedingtes Aufwinden das sogenannte Coil bildet. Mittels Strominjektion kann dieses vom Führungsdraht getrennt werden (33). Das Coil okkludiert durch anschließende Thrombosierung und verschließt damit die Gefäßaussackung.

1.1.4.3. Coiling und Clipping im Vergleich

Prinzipiell beeinflussen die Konfiguration und intrakranielle Lage des Aneurysmas, sowie die therapeutischen Möglichkeiten bezüglich medizinischer Ausstattung und Knowhow der durchführenden Ärzteschaft des jeweiligen Therapiezentrums die Wahl der Aneurysmaversorgung.

Einige Studienergebnisse zeigen, dass in Fällen, in denen beide Therapieansätze möglich sind das endovaskuläre Coiling mit einem besseren Outcome und mit besseren Langzeitergebnissen einhergeht (34, 35). Insgesamt kommt es in ca. 30% der Fälle aneurysmatischer Blutungen zu einer erneuten Blutung. Nach einer Studie von Lindgren et al und mehreren Studien von Molyneux et al zufolge ist das Risiko einer Nachblutung nach beiden Verfahren gering, nach dem Coiling jedoch etwas höher (34-36).

Um aneurysmatische SABs bereits im Vorfeld entgegen zu wirken werden cerebrale Aneurysmen je nach Größe und klinischer Beeinträchtigung oftmals schon bei Diagnosestellung ohne aufgetretene Blutung therapiert. Hierbei zeigen neueste Untersuchungen, dass das chirurgische Clipping mit einer niedrigeren Nachbehandlungsrate und mit einer höheren Inzidenz vollständiger Okklusion einhergeht. Beim endovaskulären Coiling ergaben sich ein jeweilig kürzerer Klinikaufenthalt und eine geringere Komplikationsrate, insbesondere was die Komplikation einer Ischämie betrifft (37).

1.1.4.4. Hirndruckmanagement

Die häufige Komplikation eines erhöhten ICP geht mit schweren Störungen des Hirnstoffwechsels und schlechtem Outcome einher und stellt bei Druckwerten über 20 mmHg über längere Intervalle ein Prädiktor für schwere Behinderungen und Tod dar (38). Somit ist, insbesondere bei ausbleibender adäquater Vigilanz, eine kontinuierliche Überwachung des Hirndrucks mittels ICP-Sonde oder EVD (externe Ventrikeldrainage) zu evaluieren.

Stevens et al verfasste ein orientiertes Vorgehen aus verschiedenen Studien bei intrakraniellm Hirndruckanstieg oder Herniation (39):

Stufe 0: Sobald ein erhöhter Hirndruck eruiert wird, soll überprüft werden, ob eine ausreichende Hirnperfusion, Ventilation und Sicherung der Atemwege vorliegen. ICP-steigernde Stimuli wie Absaugung der Luftröhre sollten vermieden und Elektrolytentgleisungen als auch Hyperthermie entgegengewirkt werden. Für die Optimierung der Venendrainage wird der Patient in Oberkörperhochlage (30°-45°) gelagert (13, 39). Intravenös sollten lediglich iso- oder hyperosmotische Flüssigkeiten verwendet werden (39).

Stufe 1:

Käme es zu einem akuten Hydrozephalus occlusus ist die Anlage einer EVD zu überdenken, über die es möglich ist Liquor cerebrospinalis abzulassen. Zusätzlich ist es möglich mit hyperosmolaren Flüssigkeiten wie bspw. Mannitol zu therapieren, das alle 4–6 Stunden wiederholt werden kann. Es folgt eine regelmäßige Überwachung der Serumosmolalität, da bei einer Osmolalität > 320 mOsm / kg kein therapeutischer Nutzen zu erwarten ist (39).

Bei Hirndruckspitzen ist eine Hyperventilation mit leichter bis mittelschwerer Hypokapnie (PaCO₂ 25 – 35 mmHg) in Betracht zu ziehen, die durch Vasokonstriktion zu einem geringeren zerebralen Blutfluss und damit geringeren intrakraniellen Volumenanteil führt. Eine dauerhafte Hyperventilation des intubierten Patienten ist hierbei zu vermeiden, da dies ansonsten Einbußen zerebraler Reserven und Beeinträchtigungen des oxidativen Hirnstoffwechsels bis hin zu Ischämien mit sich bringen würde (13, 40). Hilfreich ist die Anwendung eines zerebralen Oxygenierungsmonitorings (bspw. jugulare venöse Oxymetrie), um eine zerebrale Ischämie zu erfassen.

Ergeben die genannten Prozeduren keine Senkung des Hirndrucks, ist über die Indikation einer chirurgischen Dekompression zu diskutieren. Wenn eine diese nicht möglich ist eskaliert die Therapie zu Stufe 2. Spätestens zu diesem Zeitpunkt sollte eine wiederholte Bildgebung des Kopfes durchgeführt werden, um ein potentiell operativ behandelbares Korrelat zu erkennen und je nach Befund eine neue Reevaluation einer chirurgischen Therapie vorzunehmen (39).

Stufe 2:

Nach der Verabreichung von hyperosmolaren Substanzen (HTS) wird ein erhöhter Ziel-Natriumspiegel im Serum bis 160 mmol/l angepeilt. Hintergrund dessen ist das Ziel einen osmotisch wirksamen Gradienten zwischen Hirnparenchym und Serum aufrecht zu halten, um den Austritt von Wasser aus dem Hirngewebe zu fördern. Nach Stabilisierung des ICP wird der Natriumspiegel konstant gehalten bis ein merklicher Nachlass des Hirnödems bzw. Hirndrucks zu verzeichnen ist. Zusätzlich wird eine Erhöhung der Sedierung eingeleitet. Nach Kelly et al zeigt die Anwendung von Propofol nebenbefundlich eine Reduktion des ICP und zeigt somit, unter Beachtung der Gefahr eines Propofol-Infusionssyndrom bei längerer hochdosierter Anwendung, eine wünschenswerte Alternative zur Opiatsedierung (39, 41).

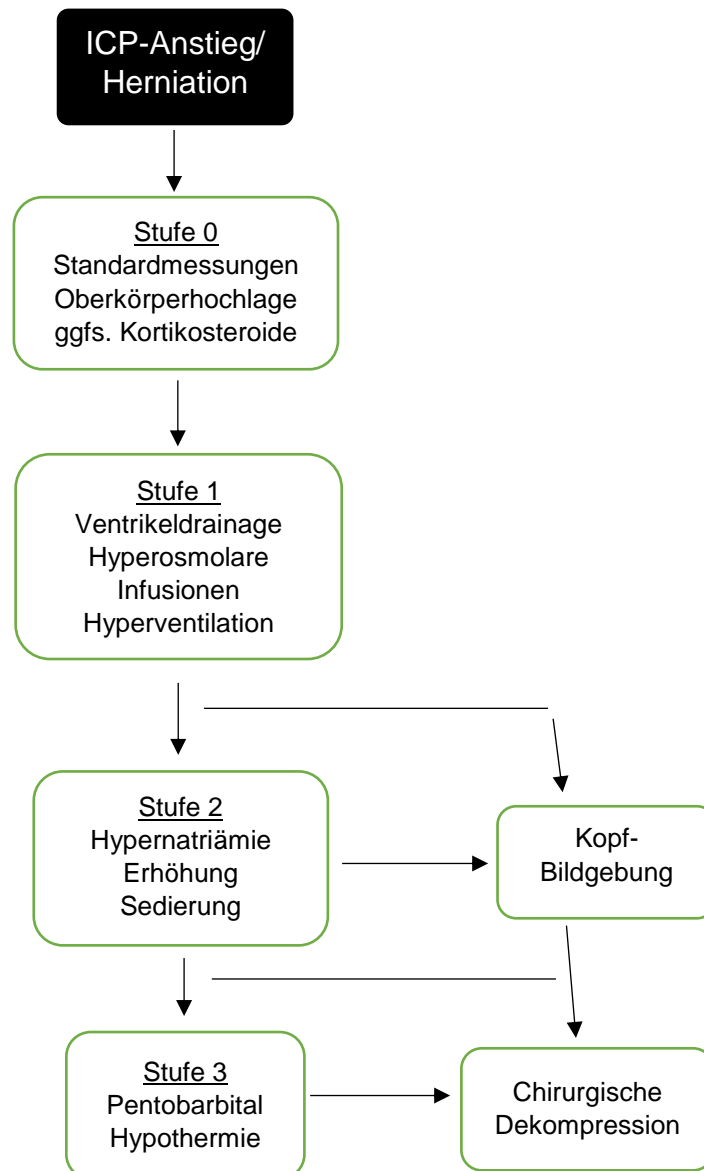
Sollte das Therapiekonzept der Stufe 2 nicht zur gewünschten Hirndrucksenkung führen sollte auch zu diesem Zeitpunkt wiederholt eine operative Dekompression in Betracht gezogen werden. Zu dieser zählen neben der „Platzierung einer ventrikulären Drainage, die Evakuierung einer extraaxialen Läsion (z. B. epidurales Hämatom), die Resektion einer intrazerebralen Läsion (z. B. Lappenblutung), die Entfernung des Gehirnparenchyms (z. B. Kleinhirnmasse) und/oder die uni- oder bilaterale Kraniektomie/n“ (39). Auch hier gilt, wenn eine Operation nicht möglich ist eskaliert das Schema zu nächst höherer Stufe.

Stufe 3:

Die Maßnahmen dieser Stufe bergen das höchste Risiko für nachteilige Auswirkungen, auch fehlen hierzu randomisierte prospektive Studien zum Nutzen. Eine Therapieoption ist eine, unter ständiger EEG-Kontrolle, Titrieren von Pentobarbital bis zum Erreichen des gewünschten ICP-Niveaus. Pentobarbital beherbergt die Gefahr der Atemdepression, kardiovaskulärer Instabilität, Immunsuppression und paralytischem Ileus, dessen Anwendung muss somit einer genauen Risiko-Nutzen Abwägung unterzogen werden (39).

Des Weiteren sieht Stufe 3 Hypothermie als mögliche protektive Maßnahme vor. Eine mäßige Unterkühlung mit Zielkerntemperatur 32 – 34 °C zeigt eine wirksame Methode zur Kontrolle der traumatischen intrakraniellen Hypertonie und ist damit mit einer Verbesserung der Mortalitäts- und Morbiditätsrate verbunden (42). Dieser Therapieansatz wird in Stufe 3 auch bei nicht traumatischen Fällen angewandt. Zu

beachten ist, dass Hypothermie mit Herzrhythmusstörungen, einer Sepsis und/ oder Elektrolytentgleisungen einhergehen kann und somit bei Anwendung einer kontinuierlichen Überwachung bedarf (39).



Dia. 1. Vorgehen bei erhöhtem intrakraniellm Druck oder Herniation nach Stevens et al (39)

Patienten mit einem hohen WNFS-Grad (Grad 3 - 5) profitieren deutlich von einer aggressiven Behandlung und es zeigt sich, dass die Gesamtmortalität dieser Patientenpopulation in den letzten vier Jahrzehnten von mehr als 50% auf ca. 35% vermindert werden konnte. Diese Behandlung umfasst die Betreuung auf einer speziellen neurologischen Intensivstation, das frühzeitige Ausschalten von

Aneurysmen, die Verwendung von multimodalem Neuromonitoring, die kontinuierliche Kontrolle von Hirndruck und Optimierung der zerebralen Sauerstoffzufuhr, die Prävention und Behandlung von medizinischen Komplikationen, sowie die Überwachung und aggressive Behandlung von verzögerten zerebralen Ischämien (13).

1.1.4.5. Blutdruckmanagement

Im Hinblick auf das Blutdruck-Management zeigen sich verschiedene Ansätze: Im Allgemeinen kann die zerebrale Autoregulation, ein Mechanismus der den zerebralen Blutfluss als Reaktion auf Änderungen des zerebralen Perfusionsdrucks aufrechterhält, bei mittleren Blutdruckwerten von ca. 60 und 150 mmHg aufrechterhalten werden. Diese Grenze wird zusätzlich moduliert durch die Aktivität des Sympathikus, das Renin- Angiotensin- Aldosteron- System und autoregulative Mechanismen (bspw. die arteriellen Kohlendioxid-Partialdruck) die den zerebralen Blutfluss zusätzlich beeinflussen können (43). Nach Budohoski et al versagt diese Autoregulation nach SAB häufig auch bereits vor einem sichtbaren Auftritt eines Vasospasmus (44). Somit ist die externe Einstellung des Blutdrucks eminent wichtig zur Aufrechterhaltung der adäquaten zerebralen Perfusion.

Innerhalb der ersten 48 Stunden nach Blutungsbeginn steht die Gefahr einer Nachblutung des Aneurysmas im Vordergrund. Nach den Richtlinien der American Heart Association / American Stroke Association sollte sowohl prophylaktisch und präklinisch (unter Berücksichtigung einer ausreichenden zerebralen Perfusion), wie auch bei diagnostizierten rupturiertem Aneurysma der mittlere arterielle Blutdruck den Wert von 110 mmHg und/oder der systolische Blutdruckwert 160 mmHg nicht überschreiten (7).

Dem entgegen setzt sich die Ansicht, dass nach der Sicherung eines Aneurysmas als Blutungsquelle aufgrund einer gestörten zerebralen Autoregulation der Perfusion und der hohen Gefahr eines verzögerten Vasospasmus ein Bluthochdruck tolerabel ist und als eine vielversprechende Komponente der hyperdynamen Therapie Anwendung finden kann (45).

1.1.4.6. Therapie des Vasospasmus

Zur Prophylaxe als auch als akute Therapie erster Wahl steht der liquorgängige, gefäßdilatierende Calciumantagonist Nimodipin, dessen Anwendung eine signifikante wirksame Risikoreduktion für ein verzögertes neurologischen Defizits aufweist (46, 47).

Darüber hinaus galt die sogenannte Tripple H-Therapie (Induktion von Hypervolämie, Hypertonie und Hämodilution) lange Zeit als vielversprechende Behandlungsmethode. Es wurde jedoch festgestellt, dass lediglich die induzierte Hypertonie (in Synergie mit hyperdynamischer Therapie) anstelle von Hypervolämie und Hämodilution eine vielversprechende Wirkung bei der Umkehrung des Vasospasmus aufweist (25).

Hierüber hinaus findet die invasivere sogenannte perkutane Angioplastie Therapieanwendung. In dieser wird eine manuelle Ballondilatation vom Karotissiphon bis zu den Segmenten der vorderen und mittleren Hirnarterien und von der Wirbelarterie zu den Segmenten der hinteren Hirnarterien durchgeführt. Dies geschieht über ein kurzes Zeitintervall bei sehr geringem Druck und führt zu einer sofortigen Erhöhung des arteriellen Kalibers. Insgesamt kommt es unter dieser Methode zu sehr guten Langzeitergebnissen (48, 49).

Als weitere Therapieoption sei die lokale Vasodilatatorinfusionen genannt, in der Nimodipin, Nicardipin oder Milrinon über die A. carotis oder A. vertebralis (kurzzeitige Wirkung) verabreicht wird. Dies findet des Öfteren auch Anwendung mit bzw. während einer perkutaner Angioplastie (25, 49).

1.2. Neuroprotektion

Nach Wiendl et al ist eine vernünftige Definition von Neuroprotektion die Erhaltung der "neuronalen Struktur und / oder Funktion" und wird allgemein als Mittel zur Verhinderung von neuronalen Schäden über kurze oder längere Zeit verstanden. Innerhalb dieser geschaffenen Zeiträume stehen Präventions-, Rettungs- und Reparaturmechanismen im Fokus, die alle einen potenziellen Einfluss auf das neuronale Überleben haben (50).

Ziel der Neuroprotektion im Falle einer experimentell provozierten SAB ist es die sekundäre Schädigung nach bereits stattgehabter Verletzung des Hirngewebes zu vermindern oder sogar vollständig zu verhindern.

1.2.1. Neuroprotektive Ansätze von Edelgasen

Die Edelgase, zu denen Helium, Neon, Argon, Krypton, Xenon, das radioaktive Radon und das künstlich erzeugte radioaktive Oganesson gehören, bilden die 8. Hauptgruppe im Periodensystem der Elemente. Edelgase existieren bei Raumtemperatur als einatomige Gase und werden aufgrund ihrer geringen chemischen Reaktivität auch Inertgase genannt (51). Diese chemische Inertheit verhindert kovalente Bindungen mit anderen Molekülen unter normalen Temperatur- und Druckbedingungen, sind jedoch paradoxerweise biologisch aktiv (52, 53). Durch ihren ungeladenen und unpolaren Zustand werden sie gut vom lipophilen Hirngewebe aufgenommen und können sich dort dementsprechend gut verteilen (54). Nicht alle Edelgase zeigten bisher neuroprotektive Eigenschaften. Während Xenon und Argon solche zugeschrieben werden konnten (s. u.) zeigten Krypton und Neon im jeweils selben experimentellen Setting keinerlei solcher Effekte (55, 56).

Untersuchungen des am häufigsten vorkommenden Edelgases Helium ergaben was die Neuroprotektion betrifft widersprüchliche Ergebnisse. Es gab experimentelle Studien, im Besonderen auf traumatische Hirnverletzungen basierend, die auf ein Ausbleiben einer Wirkung oder gar auf Neurotoxizität verwiesen, aber auch Modelle die einen protektiven Ansatz von Helium zeigten (55-57).

Neben analgetischen und anästhetischen Eigenschaften ist das Edelgas Xenon im Laufe der letzten Jahre zu einem wichtigen Bestandteil der internationalen Forschung im Bezug der Neuroprotektion geworden (58, 59). Schon mehrfach konnte diese In vitro als auch in vivo bewiesen werden, daher ist dessen biologische Wirkung am besten dokumentiert (52, 57, 59, 60). Besonders hervorgehoben wird seine neuroprotektive Wirkung in Synergie mit Hypothermie (61-63). Ferner erschien eine Therapie mit Xenon in Tiermodellen eine vielversprechende Option für den Schutz von Organtransplantaten (64). Da es nur ca. $8,75 \times 10^{-6}$ % der atmosphärischen Gase ausmacht wird, zählt es zu den selteneren Edelgasen (60).

Die Hauptmechanismen der neuroprotektiven Wirkung von Xenon wird der Verringerung der Ischämie-induzierten Neurotransmitterfreisetzung als unspezifischer Kanalblocker (u. a. AMPA- und Kainatrezeptoren in kortikalen Neuronen) und der kompetitiven Bindung und damit Blockierung des glutaminergen N-Methyl-D-Aspartat (NMDA) –Rezeptors zugesprochen. Als Antagonist des NMDA Rezeptors verhindert Xenon den Einstrom von Calcium-Ionen in die Zelle, der eigentlich über verschiedene Mechanismen für die Einleitung und Fortschreitung von Apoptose verantwortlich ist (59, 65). Zu den genannten Mechanismen die zum Zelltod führen können gehört bspw. eine Veränderung der Lipidmembranstabilität, eine Aktivierung von Calpain, das wiederum eine Aktivierung der pro-apoptotischen Kinase p83 zur Folge hat und eine Dysfunktion der Mitochondrien mit der Folge eines intrazellulär erhöhten oxydativen Stresses (59).

1.2.1.1. Das Edelgas Argon

Bei dem Edelgas Argon mit Ordnungszahl 18 handelt es sich um ein gasförmiges und nicht toxisches, geruchloses Element, das bei Temperaturen unter $-185,85^{\circ}\text{C}$ kondensiert (66). Im Gegensatz zu Xenon zeigt Argon eine geringere Reizung der Atemwege und fehlt es an einer anästhetischen Wirkung. Letzteres kann situativ bedingt als Vorteil gewertet werden, da eine Verabreichung des Gases ohne Beeinträchtigung des tatsächlichen neurologischen Status des Patienten vorgenommen werden kann (67, 68).

Trotz dem Wissen, dass Argon neuroprotektive Eigenschaften besitzt, konnte noch nicht vollständig geklärt werden welche molekularen Mechanismen dafür verantwortlich sind. Loetscher et al kamen auf das Ergebnis, dass die beste Wirkung in vivo unabhängig des Mechanismus bei einer Konzentration von 50 Vol.-% inhaliertem Argon entwickelt wird (69).

Ansätze über die Wirkweise von Argon sind jedoch schon vorhanden: In einer vergleichenden Publikation von Ulbrich et al in der eine Studie über den Ischämie-Reperfusionsschaden im Ratten-Retina-Modell vorgestellt wird, wird aufgrund der Größe des Argon-Moleküls ein rezeptorvermittelter Signalweg über die Inhibition der TLR2 und TLR4 – Rezeptoren in den Vordergrund gestellt (siehe Abb. 1). Über diese Rezeptoren wird natürlicherweise ein Signalweg induziert, der über verschiedenste Enzyme und Proteinexpressionen am Ende der Kaskade durch proinflammatorische

Zytokine, wie bspw. das NF- κ B, die Apoptose der Zelle einleitet. Ein Zwischenschritt dabei umfasst die Aktivierung der genannten proinflammatorischen Zytokine unter anderem durch die Extrazellulär regulierte Kinase 1 / 2 (ERK1 / 2). Durch die experimentellen Studien von Ulbrich und Kollegen konnte nachgewiesen werden, dass durch Anwendung von Argon durch Inhibition zum einen eine signifikante Verringerung der TLR 2- und TLR 4- Rezeptorexprimierung einhergeht und zum anderen ein signifikanter Anstieg der Phosphorylierung von ERK1 / 2 stattfindet, die somit inaktiv wird. In beiden Fällen kommt es damit zur Verhinderung der Apoptoseeinleitung. In weiteren Untersuchungen wurde jeweils eine gezielte Hemmung der TLR-Signalübertragung und ERK1 / 2-Phosphorylierung durchgeführt. In beiden Ansätzen blieb eine Hemmung der Apoptose durch Argon aus. Dies lässt schlussfolgern, dass Argon lediglich in Kombination beider Wechselwirkungen seine antiapoptotische Wirkung erzielen kann. Als Nebeneffekt der durch Argon induzierte Kaskade kommt es zur Erhaltung des Mitochondrienmembranpotentials und damit Reduktion von oxidativem Stress (66, 67). Relativ aktuell im Jahr 2016 zeigten Studien von Höllig et al zudem, dass der hypoxieinduzierte Faktor 1 α (HIF 1 α) und die Hämoxygenase 1 (HO-1) im Hippocampus nach Argonapplikation erhöht waren und sich insgesamt 24 Stunden nach SAB vergleichend eine höhere Dichte an noch funktionsfähigen Neuronen in den Hippocampusproben der Argongruppe zeigte (70).

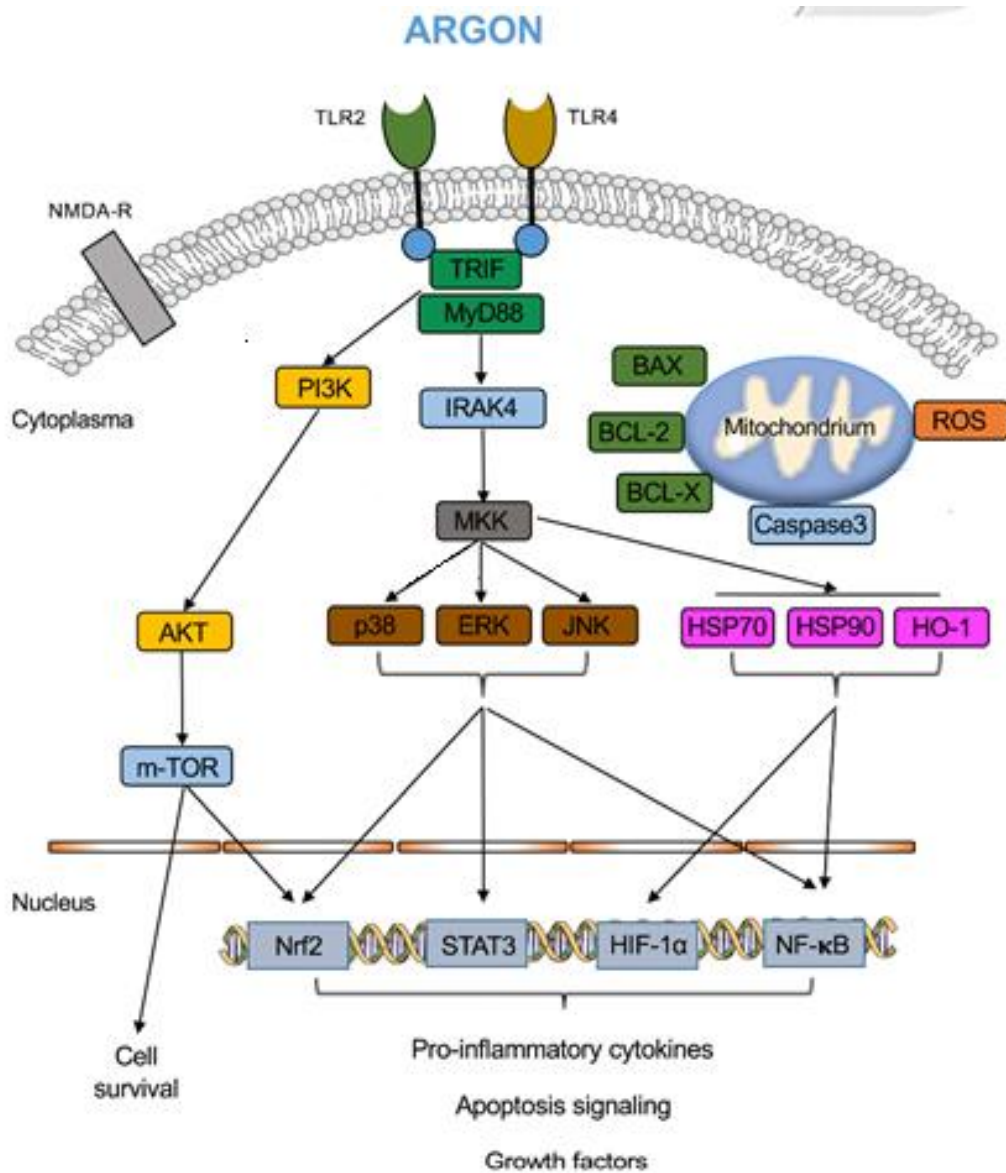


Abb. 1. Die molekularer Beeinflussung von Argon im intrazellulären Apoptose-Signalweg nach Ulbrich et al (66)

In weiteren Studien zeigten Zhao et al., dass Argon, genauso wie Xenon, in Kombination mit Hypothermietherapie zumindest im Rattenmodel einen wirksamen Schutz vor ischämischen Hirnverletzungen zeigt (64).

2. Zielsetzung

Bislang gibt es verschiedene Ansätze die eine Neuroprotektion von Edelgasen allgemein in vitro als auch in vivo erbrachten. Hierunter stand vor allem Xenon als Edelgas im Mittelpunkt der Forschung. Da es jedoch nur sehr selten vorkommt, werden Alternativen gesucht, womit u. a. das Edelgas Argon bezüglich weiterer neuroprotektiver Ansätze immer mehr in den Fokus der Forschung rückt. Im Gegensatz zu Xenon ist Argon kostengünstiger, häufiger vorkommend und besitzt bei normobarem Druck keine narkotische Wirkung. Die bisherigen Forschungen beziehen sich hierbei meist auf die Neuroprotektion nach einem Schädelhirntrauma.

Im Rahmen der folgenden Arbeit soll das Edelgas Argon bei einer SAB mittels etablierten endovaskulären Faden-Perforationsmodell an der Ratte getestet und auf seine neuroprotektiven Effekte hin untersucht werden.

3. Materialien und Methoden

Die experimentelle Durchführung an den Versuchstieren wurde gemäß § 6 Abs. 1 Satz 2 Nr. 4 TschG (Tierschutzgesetz) angezeigt und durch das Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz, Rheinland-Pfalz Deutschland genehmigt (**Aktenzeichen 177-07/G**).

3.1. Versuchstiere und Tierhaltung

Als Versuchstiere dienen männliche Ratten vom Typ Sprague Dawley. Ihr Soll-Körpergewicht bei Ausgangssituation und Versuchsbeginn wurde auf 250 - 350g festgelegt. Die Tiere wurden im Tierversuchsstall im Untergeschoss des Universitätsklinikum Mainz jeweils einzeln in Makrolon-Typ-III H-Käfigen gehalten. Diese wurden standartmäßig mit Weichholzgranulat ausgestreut und regelmäßig mit Futter und Wasser bestückt. Die Raumtemperatur des Stalls liegt durchgehend bei 20 - 24°C und es herrscht eine Luftfeuchtigkeit von ca. 50% vor. Des Weiteren unterliegt der Stall einem Hell-Dunkel-Rhythmus von zwölf Stunden.

3.2. Versuchsgruppen

Die Grundlage der experimentellen Arbeit bilden vier Untersuchungsgruppen: Eine Gruppe von Tieren erhält eine manuell provozierte SAB und wird nachträglich für 60 Minuten mit einem Argon/Sauerstoffgemisch (1:1) ventiliert (= SAB; n = 18 Versuchstiere). Die zweite Gruppe erhält keine SAB und wird trotzdem für 60 Minuten mit genanntem Gemisch ventiliert (= SHAM; n = 22 Versuchstiere). In Gruppe drei wird den Tieren eine SAB gesetzt, ohne daraufhin ventiliert zu werden (= Kontrolle; n = 10 Versuchstiere). Die vierte Gruppe beinhaltet Tiere, die keine SAB erhalten und auch nicht ventiliert werden (= K 2; n = 3 Versuchstiere).

3.3. Das Tiermodell der SAB

Da die Anatomie des Hirngewebes und dessen Blutversorgung sehr der des Menschlichen gleicht, wurden für experimentelle Studien die Neuroprotektion betreffend im Allgemeinen besonders Ratten und Mäuse als Versuchstiere herangezogen.

3.3.1. Manuelle Provokation einer SAB

Um eine SAB zu indizieren wurde nach einem endovaskulären Perforationsmodell (EVP) für Ratten gearbeitet, das oft verwendet wird, um den Verlauf von Hirnverletzungen bei akuter SAB zu beobachten (71). Im Gegensatz zum Modell der direkten Blutinjektion wird bei der angewandten EVP zum einen das Trauma nachempfunden, das bei einer Aneurysma-Perforation stattfindet und es können zum andern pathophysiologische Ereignisse die während einer potentiellen Nachblutung auftreten beobachtet werden. Es findet somit eine hämorrhagische Hirnläsion unter realem arteriellem Blutdruck statt und kommt der menschlichen SAB sehr nahe (71-73). Im Vergleich spricht Gules et al davon, dass der Schweregrad der aufgetretenen Vasospasmen in beiden Modellen ungefähr gleich ist, das EVP-Modell jedoch mit höherer Mortalität einhergeht (74). Sehba et al spricht dem gegenüber von einem vergleichsweise früheren Auftritt des Vasospasmus (nach 24 Stunden, anhaltend bis ca. 72 Stunden) mit geringerer Schwere im EVD-Modell im Besonderen die MCA und A. basilaris betreffend (71).

Das genaue Vorgehen des Perforationsmodells wird unter Punkt 3.5. „Präparation und Versuchsdurchführung“ beschrieben.

3.4. Versuchsvorbereitung

3.4.1. Wiegen und Narkose

Zu Beginn wird das Tier gewogen und das Gewicht protokolliert (Soll = 250 - 350g). Ein präoperativer Neurostatus wird erhoben wie unter Punkt 3.6. „Klinisch-neurologische Testung der Versuchstiere“ beschrieben.

Es folgt eine Sedierung des Tieres mittels Isofluran (1-Chloro-2,2,2-trifluoroethyldifluoromethylether; Forene® 100% (V/V) Inhalationsflüssigkeit) in einem Behältnis, das Anschluss an einen Narkoseverdampfer (DRÄGER Vapor 19.3) hat. Diese findet bei einem Druck von 1013 mbar (herstellernormt) mit 1Vol% für ca. 30 Sekunden statt. Es folgt mittels Subkutannadel (NADEL TYP) eine intraperitoneale Gabe einer gewichtsadaptierten Wirkstoffkombination: 68 mg/kg KG Ketaminhydrochlorid (Parke-Davis GmbH Ketanest® Injektionsfläschchen 50mg/ml auf 10ml) und 0,36 mg/kg KG Medetomidinhydrochlorid (zoetis Dorbene vet® Injektionsfläschchen 1mg/ml auf 10ml). Nach einer Wirkdauer von ca. 10 Minuten wird mit einer atraumatischen Pinzette zur Reflextestung ein Schmerzreiz an der

Schwanzspitze und an der linken Vorderpfote des Tieres gesetzt, sowie die Kornea mit einer Wattespitze gereizt um die Tiefe der Narkose zu eruieren. Erst bei entsprechender Narkosetiefe bzw. ausbleibenden Reflexen wird weiter verfahren.

3.4.2. Rasur und Fixation

Mit einem elektrischen Rasierer (FAVORITA II, REF GT 104, Aesculap AG & Co.) wird das Tier am Hals und an der Kalotte oberhalb des linken Auges auf eine Haarlänge von 0,5 mm geschoren. Beide Korneae werden mit einer Augensalbe (Cornegel®, Bausch + Lomb 10 ml Tube) großzügig bedeckt und vorsichtig mit Wattepadts abgedeckt und abgeklebt um diese vor dem Austrocknen zu bewahren. Es folgt die stereotaktische Fixation des Tieres. Dabei wird der Kopf durch zwei Bolzen, die jeweils in den Meatus externus eingeführt wird und einer Aufhängung der Zähne gehalten.

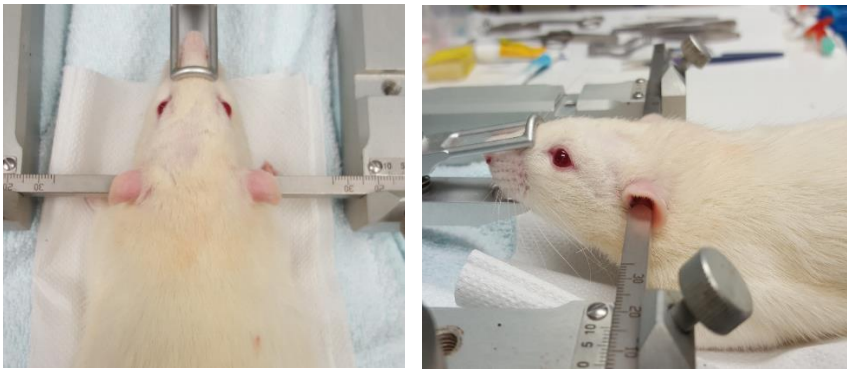


Abb. 2. Fixierung der Versuchstiere zur Laserdoppleranlage

Während der gesamten Prozedur liegt das Tier auf einem Temperaturpad, das mittels Feedbacks einer rektalen Temperatursonde die Körperkerntemperatur auf physiologischen 36,5 °C bis 37,5 °C erhält.

3.4.3. Laserdoppler - Flowmetrie

Über dem linken Auge, etwas kaudal gehalten, wird ein ca. 1 cm langer Schnitt gesetzt und stumpf bis auf den Schädelknochen präpariert. Mit einem Mikrobohrer wird ein im Durchmesser ca. 2 mm großes Loch in die Schädelkalotte bis auf die Dura mater gebohrt und darauf geachtet, dass diese dabei nicht verletzt wird. Eine an ihrem Ende flach abgetrennte Laserdopplersonde wird senkrecht auf die Dura mater aufgebracht und mit einem Tropfen Sekundenkleber (Sekundenkleber

blitzschnell MINIS, UHU, Deutschland) fixiert. Mit dieser wurde der Blutfluss sowie Flussänderungen detektiert und dokumentiert. Hiermit sollte geprüft werden, ob unter Anwendung einer Ventilation mit Argon das Phänomen der Hypoperfusion nach Beginn einer SAB beeinflusst wird.

Wie bereits beschrieben, spielt die akute Hypoperfusion des Hirngewebes eine große Rolle für die Neuropathologie und somit für das Outcome einer SAB. Laut Schubert et al kann angenommen werden, dass der Umfang des aufkommenden Perfusions - Missverhältnisses die Auswirkungen der primären Hirnverletzung widerspiegelt und dadurch ein spezifischer Anhaltspunkt für sekundäre Zelluntergänge darstellen kann, unabhängig des ICP. Zugeschrieben wird dieses Ereignis hauptsächlich der Entwicklung akuter Vasospasmen (20, 75).

3.4.4. Anlage der arteriellen Blutdrucksonde

Das Tier wird vorsichtig aus der Statik gelöst und auf den Rücken umgelagert. Es folgt das Überprüfen des Augenschutzes und der Sitz der Laserdopplersonde. Danach wird kaudal der Schwanzwurzel des Tieres eine ca. 1,0 cm lange Inzision gesetzt und stumpf die A. caudalis mediana präpariert. Diese wird mittels Pinzette kranial aufgespannt und mit einer Mikroschere angeschnitten. Distal dieses Schnittes wird die Arterie mittels Bipolarer Pinzette verödet. Durch den gesetzten Schnitt wird die Blutdrucksonde (PE50 Katheter) ca. 1 -1,5 cm intravasal nach proximal eingeführt und mittels zweier als Ligatur dienenden 2-0-Fäden (MERSILENE SH Plus, nicht resorbierbar, ETHICON © Johnson & Johnson Medical GmbH) von extern fixiert. Ggf. muss die Sonde vor Druckmessung gespült werden.

3.4.4.1. Physikalische Grundlagen der Blutdruckrelevanz

Im Allgemeinen gilt, dass der zerebrale Perfusionsdruck (CPP) als Orientierung für den globalen zerebralen Blutfluss (CBF) verwendet werden kann. Dieser lässt sich durch folgende Gleichung annähern (39):

$$CPP = MAP - ICP$$

CPP = zerebraler Perfusionsdruck

MAP = Mittlerer arterieller Druck

ICP= intrazerebraler Druck

Kommt es zu einem Hirndruckanstieg muss, um eine gleichbleibender zerebraler Perfusionsdruck aufrecht zu erhalten, der mittlere arterielle Druck ebenfalls steigen. Dies geschieht im besten Fall durch bereits erläuterte Autoregulation. Im klinischen Setting spielt bei oftmals pathologisch aufgehobener zerebraler Autoregulation die Genese des Hirndruckanstiegs und die damit einhergehende Therapiemöglichkeiten eine entscheidende Rolle.

3.4.5. Blutgasanalyse

Um einen Überblick über die Blutgase zu erhalten wird sowohl vor als auch nach der Prozedur und nach Ventilation mit dem Argon - Sauerstoffgemisch eine Blutgasanalyse durchgeführt.

3.5. Präparation und Versuchsdurchführung

Die Vorderpfoten des Tieres werden mit Klebeband (Leukosilk®, BSN medical, Deutschland) auf Schulterhöhe neben dem Körper vorsichtig auf der Unterlage befestigt. Zur Schonung des N. Vagus, der im Operationsfeld seinen Verlauf nimmt und damit einer möglichen Manipulation ausgesetzt ist, werden zwei Ampullen Atropin (entsprechend 1mg; 0.5mg/ml Glasampulle Atropinsulfat, B Braun Melsungen AG, Deutschland) intraperitoneal appliziert. Da das Tier während des Versuchs urinieren wird folgen im Verlauf je zwei bis drei intraperitoneale Applikationen von 2ml NaCl-Lösung (Isotone Kochsalzlösung 0,9%, B Braun Melsungen AG, Deutschland), um den Wasserhaushalt des Tieres zu balancieren. Diese finden vor Eröffnung des Operationsgebietes, nach der Versuchsdurchführung vor der Ventilation, sowie nach der Ventilation statt. Dementsprechend erhalten die Kontrollgruppe und die K2 - Gruppe zwei, SHAM und SAB drei Applikationen von je 2 ml NaCl Lösung.

Mit dem Skalpell wird ein Schnitt gesetzt, der ca. 2 cm unterhalb der Mandibula beginnt und bis zum Jugulum des Tieres reicht (ca. 3 cm). Ein Gewebespreizer dient zum Offenhalten des Operationsgebietes. Mittels Mikropinzette wird stumpf die rechte A. carotis communis (CCA) und die kranial gelegene Carotisgabel, sowie deren Abgänge A. carotis interna (ACI) und A. carotis externa (ECA) freigelegt. Zur Prävention einer Verletzung des rechten N. Vagus wird dieser zusätzlich vorsichtig

freigelegt und mittels Ligatur markiert. Es folgt das Abklemmen der A. carotis communis ca. 5 mm proximal der Bifurkation sowie der nach laterokraniel verlaufenden A. carotis interna ca. 5 mm distal der Bifurkation jeweils mittels Gefäßclip.

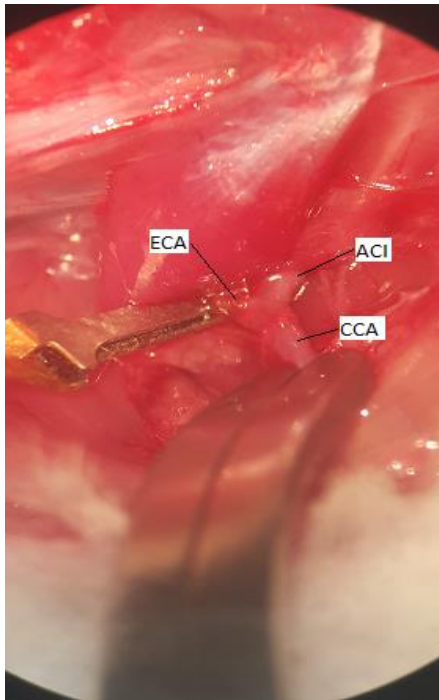


Abb. 3. Eine mikroskopische intraoperative Darstellung der Bifurkation der rechten CCA

In manchen Fällen führt die ECA ihren ersten Abgang die A. thyroidea superior relativ nahe der Bifurkation. Wenn diese ihren Ursprung innerhalb der ersten 5 mm des proximalen Abschnittes der ECA findet wird sie verödet und vom Hauptstamm abgetrennt, um darauffolgende Blutungen nach Eröffnung der Gefäße zu vermeiden. Die ECA wird ca. 5 mm distal der Bifurkation mittels bipolarer Pinzette verödet und proximal dieser Verödung mittels Mikroschere eröffnet. Ein zuvor auf 5 cm spitz zugeschnittener Faden der Größe 5-0 (PROLENE, monofil, nicht resorbierbar, ETHICON © Johnson & Johnson Medical GmbH) wird nun über den offenen Stumpf ECA über die Bifurkation in die ACI bis zum Gefäßclip eingeführt. Der Gefäßclip der ACI wird entfernt und der Faden wird vorgeschoben bis zu einem Widerstand. Dieser Widerstand stellt, mit der Ausnahme natürlicher Gefäßanomalien, die Bifurkation der A. cerebri media (MCA) und A. cerebri anterior (ACA) dar. Es gilt an dieser Stelle mittels spitzen Fadenendes die Gefäßwand zu perforieren und somit eine

Subarachnoidalblutung auszulösen. Im Mittel wird der Faden vom Stumpf der ECA 1,8 – 2,2 cm vorgeschoben, um eine Perforation zu erlangen.

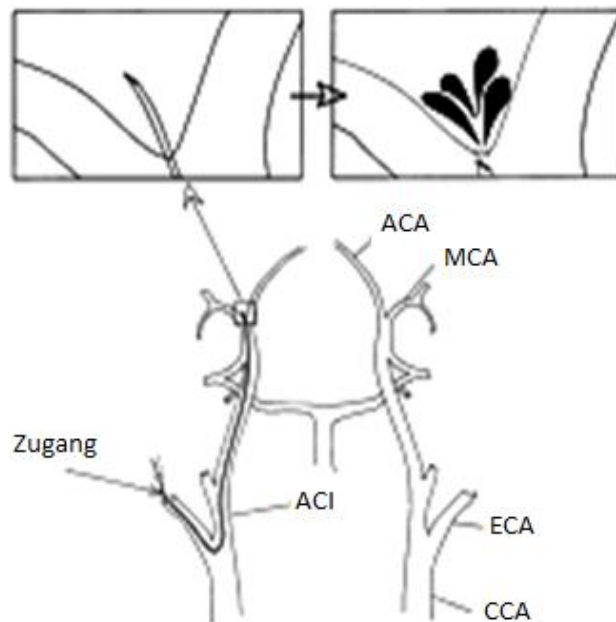


Abb. 4. Schema zur Perforation an der Bifurkation von ACA und MCA

Nach vermeintlicher Perforation wird der Faden wieder herausgezogen und der Stumpf der ECA verödet. Durch Entfernen des Gefäßclips unterhalb der Bifurkation erfolgt die Reperfusion des Hirns über die rechte CCA. Es werden zehn Minuten abgewartet, um eine Veränderung der Laserdoppler-Flowmetrie und des mittleren arteriellen Blutdrucks zu beobachten und zu detektieren. Es folgt die Halsnaht und die zweite Applikation von 2 ml NaCl Lösung intraperitoneal (s.o.). Das Tier wird auf dem Rücken liegend belassen, von der Fixation der Vorderfüße gelöst und nun mit einem Argon-Sauerstoffgemisch (Firma Linde Gas Therapeutics GmbH, Oberschleißheim; Zusammensetzung 50% Argon 5.0, Rest Sauerstoff 4.5 mit standardisierter Herstellertoleranz und Messunsicherheit) unter Verwendung von Kapnometrie bei einem Druck von 5 bar und einer Labor-Zimmertemperatur von 21 - 24°C für 60 Minuten ventiliert. Dies wird durch eine selbst konstruierte Atemmaske gewährleistet, die über einen Schlauch mit der Gasflasche verbunden ist. Ein Flowmeter ist zwischengeschaltet, um einen gleichmäßigen Flussdruck von 5 bar einstellen und kontrollieren zu können.



Abb. 5. Ventilation des Argon-/Sauerstoffgemisches

Nach den 60 Minuten wird dem Tier Atimapezolhydrochlorid (Pfizer Alzane ® Injektionsfläschchen 5mg/ml auf 10ml) in der Dosierung 2 mg/kg KG sowie eine gewichtsadaptierte Schmerzmedikation in Form von Tramadolhydrochlorid intraperitoneal verabreicht. Dem Tier wird die rektale Temperatursonde gezogen und es wird zurück in den Käfig gelegt. Unter einer Rotlichtlampe, die 40 cm oberhalb des Tieres angebracht wird, wird die Ratte warmgehalten, bis sie wieder wach geworden ist. Es wird eine Wasserflasche präpariert mit 5 Hüben Tramadolhydrochlorid (AbZ Tramadol 100 mg/ml Tropfen; 1 Hub entspricht 5 Tropfen) auf 100 ml Wasser, zur weiteren Schmerzlinderung.

3.6. Klinisch-neurologische Testung der Versuchstiere

Schon in vorigen Studien konnte belegt werden, dass Ratten nach künstlich hinzugezogener SAB signifikante Verhaltensauffälligkeiten unter Anderem in Bezug auf lokomotorische Aktivitäten zeigen können (76). Somit erfolgte sowohl vor als auch 12 Stunden nach der Intervention (nach vollständigem Abklingen der Narkose) ein Neuroscoring, um im Vorfeld eine neurologische Unversehrtheit und im Nachhinein eine neurologische Beeinträchtigung des jeweiligen Versuchstieres zu manifestieren. Dieses Neuroscoring wurde von einer unabhängigen Person durchgeführt, die keinerlei Informationen zur Behandlungsart des jeweiligen Tieres erhielt. Durch diese Verblindung des Untersuchers konnte gewährleistet werden, dass eine individuelle Erwartungshaltung das Ergebnis der Testungen verfälscht.

Die Testung verlief durch eine etwas abgewandelte Version des Schemas nach Nedelmann et al, dessen Ergebnis in Form einer Punktzahl eine hohe Korrelation mit dem Ausmaß einer zerebralen Ischämie und damit Untergang von Neuronen bei Ratten zeigt (77) . Wir behielten aus diesem Schema folgende Testungen bei: Zum einen das Hochheben der Ratte am Schwanz. Hierbei ist eine kontralaterale Vorderpfotenflexion als Parese und das Hochwinden des Körpers Richtung Schwanz als pathologisch zu werten. Danach wird das Versuchstier wieder auf einen ebenen Untergrund abgesetzt und beobachtet ob ein sogenanntes „circling“, also ein Drehen im Kreis, ein „driftig“ also Abweichen auf eine Seite oder eine Unbeweglichkeit ggfs. auch Vigilanzminderung bei freiem Auslauf auftritt und ebenfalls als Pathologie zu werten ist. Es folgt die Berührung der Schnurrhaare und das Setzen akustischer Reize (das Klatschen in die Hände), kommt es zu keiner Reaktion ist auch dies als pathologisch zu sehen. Zuletzt wird das Gleichgewicht durch Druckausübung auf jeweils eine Seite getestet und beobachtet ob das Tier seinen Kurs trotzdem halten kann.

Wir ergänzten die Testung mit dem sogenannten „Righting“ und „Placing“. Beim Righting wird die Ratte auf den Rücken gelegt und beobachtet ob diese fähig ist sich instinktiv wieder eigenständig auf den Bauch zu rollen. Das Placing beschreibt das Aufrechterhalten des Gleichgewichtes beim Bewegen des Untergrundes (in unserem Fall das Schwenken der Untersucherfläche).

Die genauen Ergebnisse des Neuroscores werden in Dia. 9. aufgezeigt.

3.7. Gewebeuntersuchung

Aufgrund erhöhter Mortalität nach SAB wurde schon 12 Stunden nach dem Setzen der Hirnblutung nach genanntem Neuroscoring die Entfernung des Rattenhirns durchgeführt.

Die Rattenhirne wurden ohne Hinweis der Zugehörigkeit der Versuchsgruppe dem Neuropathologischen Institut der Universitätsmedizin Mainz übergeben zur weiteren histopathologischen und immunhistochemischen Untersuchung, deren Ergebnisse im Weiteren genannt werden.

3.7.1. Pufferapplikation

Um eine adäquate Konservierung des Hirns für weitere Untersuchungen zu gewährleisten wurde die Injektion von 600 ml Phosphatpuffer (Zusammensetzung: 150-200ml $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ (0,1 mol entspricht 13,8 g/L mit PH 4,4) mit 500ml $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ (0,1 mol entspricht 17,3 g/L mit PH 9,4)) mit PH 7,4 bei noch bestehender Kreislaufzirkulation vorgenommen.

Im Vorfeld wurden die genannten 600 ml des Puffers in ein Infusionssystem überführt und dieses entlüftet. Am Ende des Infusionssystems wurde eine stumpfe Aufziehkanüle angebracht.

Das Versuchstier wurde in eine durchsichtige, luftdichte Box mit Anschluss an eine Kohlenstoffdioxid-Flasche gesetzt. Kohlenstoffdioxid wurde der Box so lange hinzugeführt bis bei dem Versuchstier eine Kohlenstoffdioxid-Narkose eintrat. Hierbei wurde drauf geachtet, dass der Zeitpunkt vor dem Eintritt eines Herzkreislaufstillstandes abgepasst wurde. Im Mittel wurde das Gas für 2 - 3 Minuten hinzugefügt unter Beobachtung des Atemrhythmus und der Vigilanz.

Danach wurde das Tier rücklings in eine Nierenschale gelegt und die Reflexe wie schon vor Intervention ausgiebig getestet. Erst nach Ausbleiben dieser wurde die Prozedur weitergeführt. Unterhalb des Sternums wurde mit einer Schere der Bauchraum eröffnet. Des Weiteren kam es nach Perforation des Zwerchfells zu einem Kollabieren beider Lungenflügel. Der Brustkorb wurde linksseitig entlang des Sternums durch Durchtrennung der Rippenbögen eröffnet. Durch einen Spreizer wurde das noch schlagende Herz freigelegt. Nun wurde mit der stumpfen Aufziehkanüle der linke Ventrikel punktiert und diese mittels Klemme fixiert. Es folgte die Perforation des rechten Atriums und Starten der Infusion zum Ausschwemmen des gesamten Blutes und Konservierung des gesamten Körpers mit Fokus auf das Hirn. Die Pufferlösung bewirkte durch eine Elektrolytverschiebung eine Kontraktion aller perfundierten Extremitäten und des Kiefers des Versuchstieres. Nach Applikation der gesamten 600 ml wurde die Infusion entfernt.

3.7.2. Entnahme des Gehirns

Es folgte die Kraniektomie des Tieres. Hierzu wurde ein Schnitt medial des Schädels gesetzt und mittels Spreizer die Schädelkalotte freigelegt. Es erfolgte die Entfernung der Musculi Temporales beidseits der Kalotte und die vorsichtige Eröffnung des Schädels entlang der Sutura sagittalis. Von diesem Schnitt aus wurden Teile der Kalotte vorsichtig mit einer kleinen Zange nach temporal entfernt bis das Hirn komplett frei lag. Mit einem Dissektor wurde das Hirn nun durch Durchtrennung der basalen Hirnnerven und des Hirnstamms von der Schädelbasis gelöst und mobilisiert. Das Hirn, wie auch die Schädelbasis werden makroskopisch bezüglich einer Subarachnoidalblutung beurteilt und schließlich in genanntem Phosphatpuffer konserviert.

3.7.3. Neuropathologische Begutachtung

Nach Überführung der konservierten Rattenhirne an das neuropathologische Institut der Universitätsmedizin Mainz wurden diese in Paraffin eingebettet und coronare Hirnschnitte angefertigt. Es erfolgte zunächst eine HE-Färbung, um die Versuchstiere im Hinblick auf stattgehabte oder ausgebliebene SAB morphologisch einzuteilen. Des Weiteren wurden die Präparate immunhistochemisch auf die Expression von GFAP und Iba1 untersucht und verglichen. Im letzten Schritt wurde die jeweilige A. basilaris bezüglich ihres Durchmessers, ihrer Durchflussfläche und Gefäßdicke bemessen.

3.7.3.1. Gefäßmorphologie der Aa. basillares

Wie bereits erwähnt ist es dem zerebralen Gefäßsystem durch Autoregulation möglich trotz Änderungen des Blutdrucks bzw. des zerebralen Perfusionsdrucks einen stabilen zerebralen Blutfluss aufrechtzuerhalten (43, 78).

Unter normalen Umständen kommt es durch eine Regulation des arteriellen Gefäßdurchmessers (herbeigeführt durch verschiedenste myogene, neurogene, endotheliale und metabolische Reaktionen auf die nicht weiter eingegangen wird) zur Änderungen des zerebrovaskulären Widerstands, und damit zu einer Stellschraube für die zerebrale Perfusion (78).

Nach Budohoski et al versagt diese zerebrale Autoregulation allerdings nach einer SAB, häufig auch schon bevor ein Vasospasmus überhaupt sichtbar wird (44). Damit

kann die Auswirkung eines Vasospasmus vorerst nicht oder zumindest nicht hinreichend adäquat durch autogene Regulationsmechanismen kompensiert werden. Um ein messbares Korrelat im Bezug zum Auftritt eines Vasospasmus und der cerebralen Perfusion neben den Messungen mit dem Laserdoppler zu erhalten wurden die Hirnschnitte histomorphologisch an den Aa. basilares gemessen. Dafür wurde der Gefäßdurchmesser, die Gefäßdurchflussfläche und die Gefäßwanddicke in den einzelnen Gruppen erhoben und miteinander verglichen.

3.7.3.2. Gliafibrilläres saures Protein (GFAP)

GFAP ist ein IFIII-Protein (intermediäres Filament) das in Astrozyten und Ependymzellen des ZNS, in nicht-myelinisierenden Schwann-Zellen des PNS und in enterischen Gliazellen vorkommt und bei der Wundheilung von Neuronen exprimiert wird. Die GFAP-Genaktivierung und Proteininduktion spielen nach ZNS-Verletzungen und Neurodegeneration eine entscheidende Rolle bei der Astroglia-Zellaktivierung (Astrogliose). GFAP und seine Abbauprodukte werden nach traumatischen Hirn- und Rückenmarksverletzungen sowie bei Schlaganfällen freigesetzt. Damit stehen sie als Korrelat für die Astrozytenaktivität und als Biomarker für besagte neurologischen Erkrankungen zur Verfügung (79). Klinisch kann das gebildete Wundgewebe aus Astroglia die axonale Regeneration und die funktionelle Wiederherstellung von Neuronen stören (80).

3.7.3.3. Ionisierendes Calcium-bindendes Adaptermolekül (Iba1)

Bei Iba1 handelt es sich um ein Protein, das ausschließlich von Mikrogliazellen und Makrophagen exprimiert wird. Kommt es zur Aktivierung von Mikrogliazellen aufgrund einer Ischämie oder einer Degeneration von Nervengewebe folgt eine Hochregulation der Iba1-Expression. Damit steht die Iba1 - Konzentration als Pendant für die Mikrogliaaktivität und Schädigung von Nervengewebe. Mikrogliazellen im Allgemeinen regulieren unter anderem die Immunabwehr des Hirngewebes und die Regeneration zerstörten Nervengewebes (81).

4. Ergebnisse

Insgesamt wurde mit 30 Tieren in der SAB(+) Argon Gruppe (= SAB) gearbeitet, hiervon sind 13 Tiere vor Erreichen der Phosphatpuffer-Applikation verstorben (Mortalität 43,3%) und bei 10 Tieren (33,3%) konnte die Applikation erfolgreich durchgeführt und damit eine histologische Begutachtung eingeleitet werden. Bei 9 Tieren (30,0%) konnte eine adäquate arterielle Blutdruckmessung und bei 8 Tieren (26,7%) eine adäquate Laserdopplermessung detektiert werden.

22 Tiere wurden in die Sham(+) Argon Gruppe (= SHAM) miteingeschlossen, davon ist keines der Tiere verfrüht verstorben (0,0%). 13 Tiere konnten erfolgreich Puffer-appliziert und histologisch ausgewertet werden (59,1%) und bei 6 Tieren (27,3%) konnte eine adäquate arterielle Blutdruckmessung, bei 5 Tieren (22,7%) eine adäquate Laserdopplermessung durchgeführt werden.

10 Tiere gehörten der SAB(-) Argon Gruppe (= Kontrolle) an, wovon 2 verfrüht verstorben sind (20,0%). 4 Versuchstiere wurden erfolgreich mit Phosphatpuffer perfundiert und standen zur histologischen Begutachtung aus (40,0%). Insgesamt konnten bei 6 Tieren (60,0%) bzw. 3 Tieren (30,0%) jeweils eine adäquate arterielle Blutdruck- und Laserdopplermessungen eruiert werden.

Zuletzt zählten 3 Versuchstiere zur Sham(-) Argon Gruppe (= K2), von denen jedes histopathologisch ausgewertet werden konnte. Bei 2 der Versuchstiere gelang eine Laserdoppler-, bei nur einem Tier eine adäquate arterielle Blutdruckmessung.

Morphologische Analyse der Rattenhirne

Nachdem die auswertbaren Rattenhirne nach Konservierung in dünne Scheiben geschnitten wurden, wurden sie mittels Hämatoxylin-Eosin eingefärbt und mikroskopisch begutachtet.

In der SAB(+) Gruppe ließen sich bei n= 13 ausgewerteten Hirnen 8 Tiere mit intraventrikulärer Blutung (IVB mit 61,5 %) und 3 Tiere mit intraparenchymaler Blutung (ICB mit 23,0 %) nachweisen. In der SAB(-) Gruppe konnten bei n = 5 Tieren 4 Tiere mit intraventrikulärer Blutung (IVH mit 80,0%) und 1 Tier mit intraparenchymaler Blutung (ICB mit 20,0%) erfasst werden.

	IVB	ICB
SAB + Argon (n = 13)	8 (= 61,5%)	3 (= 23,0%)
SAB – Argon (n = 5)	4 (= 80,0%)	1 (= 20,0%)

Tab. 4. Verteilung der Versuchstiere nach Art der intrakraniellen Blutung

Je nach makroskopischem Ausmaß der Blutung konnten die Tiere der SAB-Gruppen nach Grad I-III eingeteilt werden. Zur SAB(+) Argon Gruppe konnten von n = 18 Tiere 5 Tiere Grad I (27,8%), 8 Tiere Grad II (44,4%) und 5 Tiere Grad III (27,8%) zugeordnet werden. Aus der SAB(-) Argon Gruppe verteilten sich die Zahlen der n= 10 Tiere auf 4 Tiere zu Grad I (40,0%), 3 Tiere zu Grad II (30,0%) und 3 Tiere zu Grad III (30,0%).



Abb. 6. Makroskopischer Grad der SAB

	Grad I	Grad II	Grad III
SAB + Argon (n = 18)	8 (= 44,4%)	7 (= 38,9%)	3 (= 16,7%)
SAB – Argon (n = 10)	4 (= 40,0%)	3 (= 30,0%)	3 (= 30,0%)

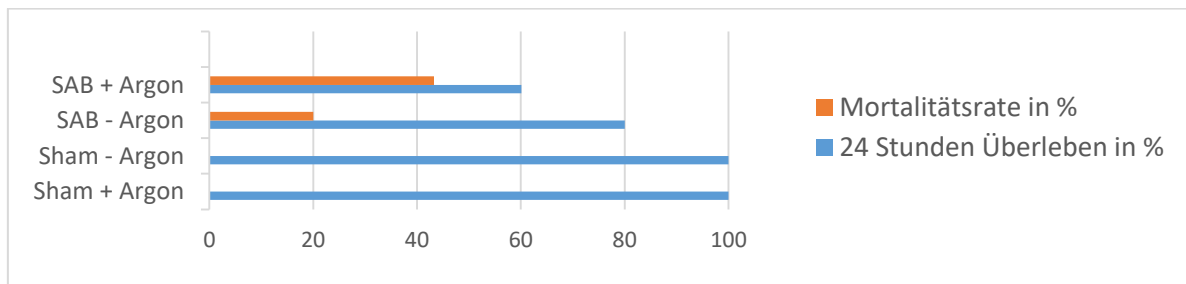
Tab. 5. Verteilung nach Ausmaß des Blutungsgeschehens

Mortalitätsrate

Während sich in den beiden SHAM-Gruppen eine jeweils 100 prozentige Überlebensrate in den ersten 12 Stunden ab Argonventilation ergab, zeichnete sich in der SAB(+) Argon Gruppe eine Mortalitätsrate von 43,3 % und in der SAB(-) Argon

Gruppe ohne Argonventilation eine Mortalitätsrate von 20,0 % innerhalb der ersten 12 Stunden nach Ventilation ab.

In Bezug auf alle insgesamt mit dem EVP-Modell intervenierten Tiere zeichnete sich bei n = 37 und 14 verstorbenen Tieren vor Hirnentnahme eine Mortalitätsrate von 37,84% ab.



Dia. 2. 24-Stunden-Überleben und Mortalitätsrate in %

Arterieller Mitteldruck und regionale zerebrale Perfusion

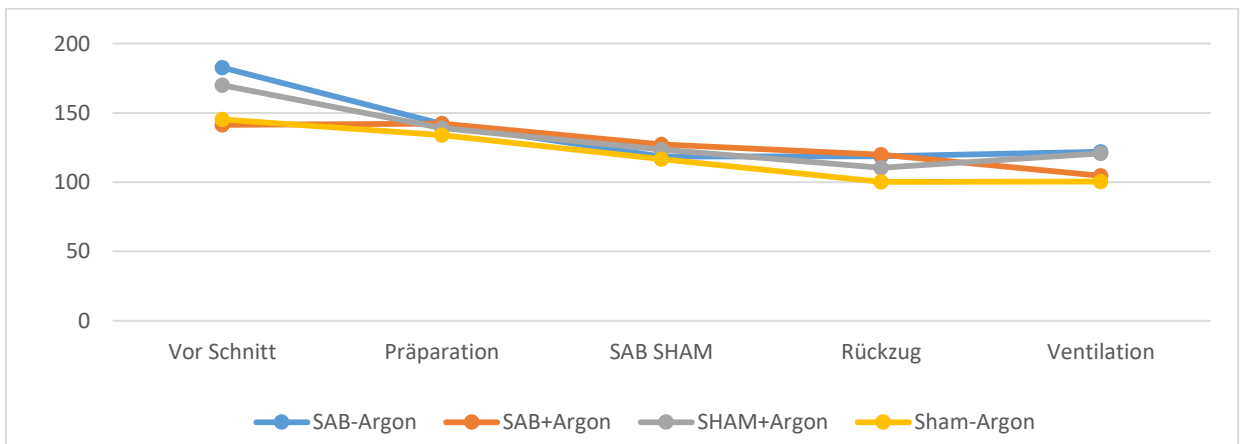
Insgesamt zeigte sich in den SAB-Gruppen mit und ohne Argonventilation als auch in der Sham-Gruppe mit Argonventilation kein signifikanter Unterschied bezüglich des zerebralen Blutflusses im zeitlichen Verlauf. Währenddessen konnte jedoch in den drei genannten Gruppen eine signifikante Senkung des mittleren arteriellen Blutdrucks eruiert werden.

ml/g/min	SAB(+) Argon (n = 8)	SAB(-) Argon (n =6)	Sham(+) Argon (n =5)
Vor Schnitt – Präparation	141,77 ± 71,70	162,48 ± 71,06	154,53 ± 64,23
SAB-Provokation /ausbleibende SAB – Schließen	123,64 ± 60,85	118,60 ± 90,47	117,03 ± 44,06
Ventilation	104,53 ± 45,33	121,87 ± 69,85	113,27 ± 47,81
p-Wert	0,388 -> n.s.	0,396 → n.s.	0,218 → n.s.

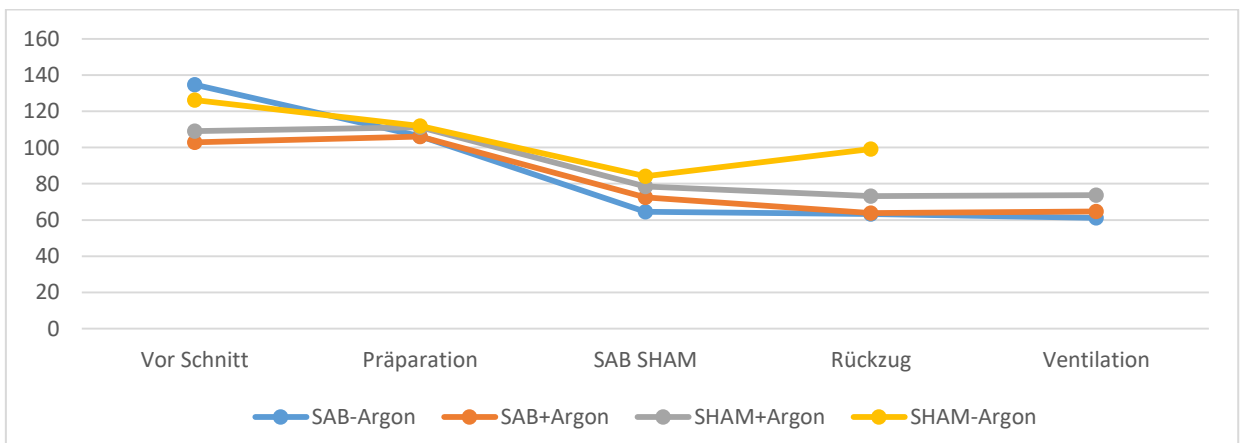
Tab. 6. ANOVA 1-way Auswertung regionaler zerebrale Perfusion in ml/g/ml im zeitlichen Vergleich

mmHg	SAB(+) Argon (n = 9)	SAB(-) Argon (n = 6)	Sham(+) Argon (n = 6)
Vor Schnitt – Präparation	101,10 ± 19,16	120,27 ± 18,45	110,19 ± 24,67
SAB-Provokation /ausbleibende SAB –Schließen	68,16 ± 19,49	67,86 ± 13,42	75,80 ± 12,91
Ventilation	64,72 ± 9,71	61,22 ± 4,65	73,76 ± 6,11
P-Wert	< 0,00 → signifikant	< 0,00 → signifikant	< 0,00 → signifikant

Tab. 7. ANOVA 1-way Auswertung des mittleren arteriellen Blutdruck (in mmHg) im zeitlichen Vergleich.

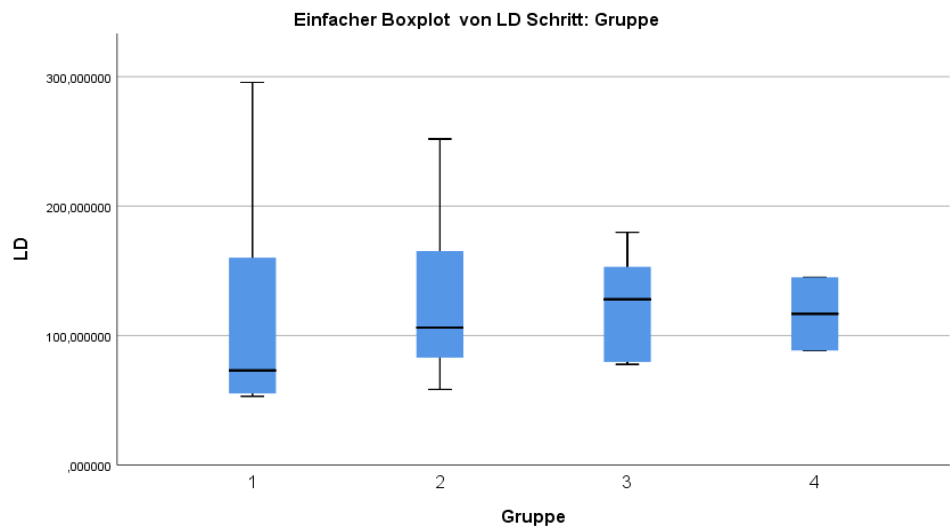


Dia. 3. Der regionale zerebrale Blutfluss aller Gruppen im Zeitverlauf

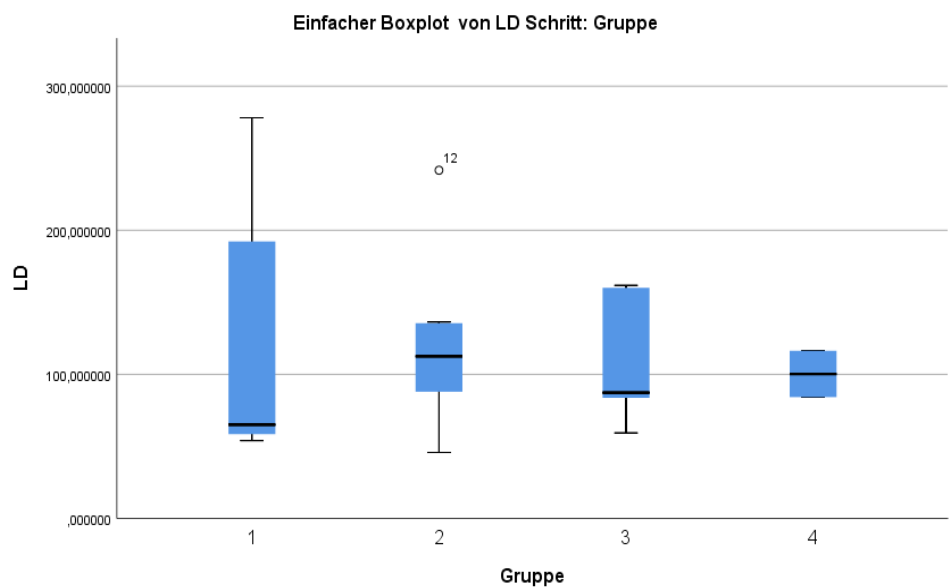


Dia. 4. Der mittlere art. Blutdruck (Mittelwerte) im Vergleich der einzelnen Gruppen im Verlauf.

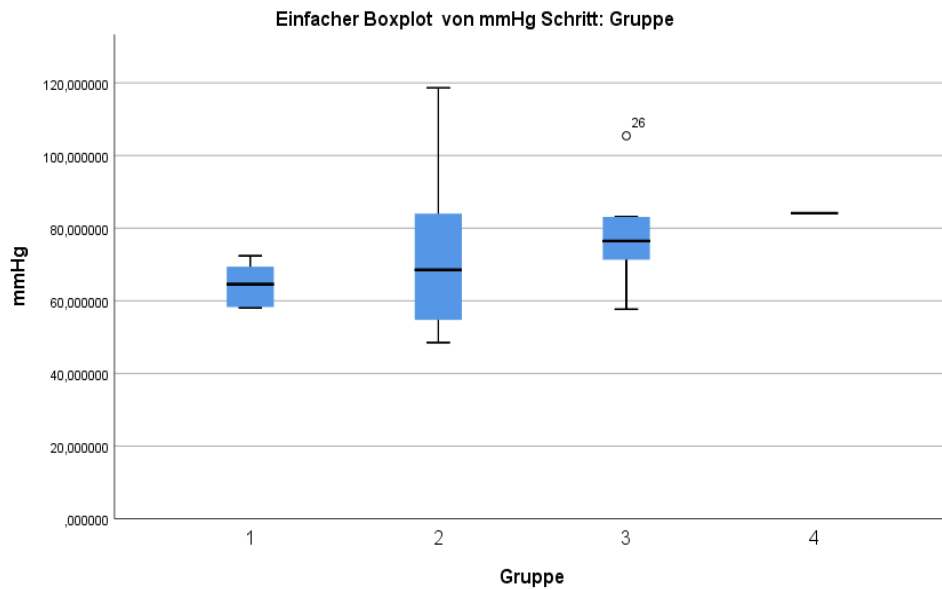
Gruppe 1 = SAB – Argon
 Gruppe 2 = SAB + Argon
 Gruppe 3 = Sham + Argon
 Gruppe 4 = Sham - Argon



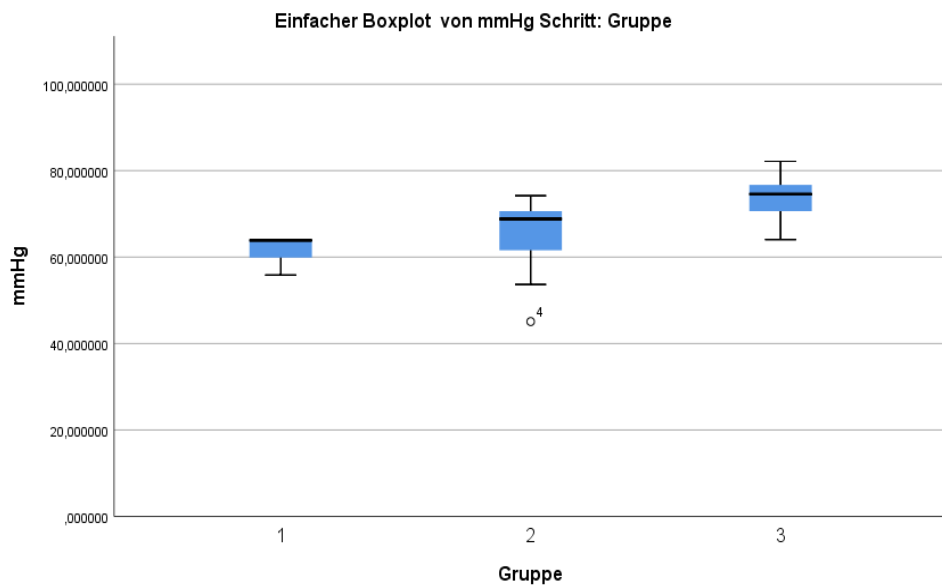
Dia. 5. Mittelwerte der Laserdopplermessungen (rCBF) in ml/g/min bei SAB-Provokation/ bei ausbleibender SAB in den einzelnen Gruppen



Dia. 6. Mittelwerte der Laserdopplermessungen (rCBF) in ml/g/min während der Argon- Ventilation in den einzelnen Gruppen



Dia. 7. Mittelwerte der mittleren art. Blutdruckmessungen in mmHg kurz nach SAB-Provokation/ ausbleibender SAB bis Argon-Ventilation in den einzelnen Gruppen



Dia. 8. Mittelwerte der mittleren art. Blutdruckmessungen in mmHg während der Argon-Ventilation in den einzelnen Gruppen

Es wurden die Mittelwerte der Laserdoppler- und mittleren arteriellen Blutdruckmessungen in den einzelnen Gruppen während SAB-Provokation / ausbleibender Perforation, sowie in der Zeitspanne zwischen besagtem Ereignis und Ventilation und während der Ventilation selbst verglichen. Insgesamt ergaben sich jeweils keine signifikanten Unterschiede im Vergleich der einzelnen Gruppen.

		SAB + Argon	SAB – Argon	Sham + Argon	Sham – Argon	p-Wert
rCRB in ml/g/min	Perforation	(n = 8) 127,37 ± 67,58	(n = 6) 118,37 ± 95,57	(n = 5) 123,64 ± 45,00	(n = 2) 116,72 ± 39,98	0,995 → n.s.
	Perforation bis Ventilation	(n = 8) 119,91 ± 57,76	(n = 6) 118,83 ± 94,21	(n = 5) 110,42 ± 47,34	(n = 2) 100,26 ± 22,78	0,980 → n.s.
	Ventilation	(n = 8) 104,53 ± 45,33	(n = 3) 121,87 ± 69,85	(n = 5) 120,73 ± 49,40		0,811 → n.s.
Art. Blutdruck in mmHg	Perforation	(n = 9) 72,42 ± 22,34	(n = 6) 64,55 ± 6,02	(n = 6) 78,41 ± 15,75	(n = 1) 84,13	0,508 → n.s.
	Perforation bis Ventilation	(n = 9) 63,90 ± 14,34	(n = 6) 63,25 ± 12,00	(n = 6) 73,20 ± 10,12	(n = 1) 99,20	0,089 → n.s.
	Ventilation	(n = 9) 64,72 ± 9,71	(n = 3) 61,22 ± 4,65	(n = 6) 73,78 ± 9,10		0,069 → n.s.

Tab. 8. ANOVA 1-way Auswertung der Mittelwerte des rCRB und arteriellen Blutdrucks mit Standardabweichung in den einzelnen Gruppen.

Histopathologische Analyse

Die Hirne wurden zuerst mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt, eine Standardfärbemethode in der Histologie. Hierbei färbt das Hämatoxylin Strukturen die sauer bzw. basophil sind (z.B. DNA oder Ribosomen) blau und das Eosin basische Zellstrukturen (z.B. Proteine des Zytoplasma oder der Mitochondrien) rot.

Das zu untersuchende Rattenhirn wird direkt nach der Entnahme mittels Phosphatpuffer (Natriumdihydrogenphosphat- mit Dinatriumhydrogenphosphat) konserviert und mittels 1:10 verdünnter 40%iger Formaldehydlösung 24 Stunden fixiert. Es folgt das stufenweise Entwässern durch Einlegen in Alkohol in aufsteigender Ethanol-Konzentration für jeweils weitere 24 Stunden. Dies beinhaltet 5 Entwässerungsstufen. Die Hirne werden daraufhin jeweils dreimal weitere 24 Stunden bei 60°C in drei eigenen mit Paraffin gefüllten Gefäßen eingebettet. Dies führt zu einem Ersetzen des Alkohols als Intermedium durch Paraffin.

Es folgt das Anfertigen koronarer Hirnschnitte mittels Mikrotom mit einer Dicke von 3 µm und das Anbringen die Schnitte auf mit Eiweißglycerin beschichtete Objektträger. Die Schnitte werden daraufhin Entparaffiniert, in dem sie jeweils 3 Minuten in 8 aufeinander folgenden Lösungen gestellt werden. Diese bestehen aus Xylol, Isopropanol und Brennspiritus und unterscheiden sich in ihrer jeweiligen Konzentration. Die Schnitte erscheinen daraufhin farblos und können dann eingefärbt werden.

Die Hämatoxylin-Eosin Färbung der Hirnschnitte wird mit dem Einlegen in Hämatoxylinlösung (Hämatoxylin nach MAYER) bei leicht sauren Verhältnissen für 5 Minuten begonnen mit nachfolgendem Überführen in destilliertes Aqua für wenige Sekunden und zweimaliges Überführen in Leitungswasser für jeweils 3 Minuten. Hierdurch kommt es zu einem Farbumschlag von bräunlich zu bläulich. Danach werden die Präparate in 50%igen Brennspiritus, dann in Eosinlösung jeweils auch für 3 Minuten eingelegt und schlussendlich in Isopropanol ausgeschwenkt und weitere 5 Minuten in Isopropanol Stufe 2 eingelegt. Es folgt das Übertragen der Schnitte in Xylol Stufe 1 für drei und Xylol Stufe 2 für fünf Minuten. Die fertig eingefärbten Schnitte werden nun mit Kunstharz eingeschlossen und mikroskopisch begutachtet werden.

Bei 3 Tieren der SAB(+) Argon Gruppe konnte mittels HE-Färbung histomorphologisch Ischämien (23,0%) dargestellt werden. Diese fanden sich in keiner der anderen Tiergruppen.

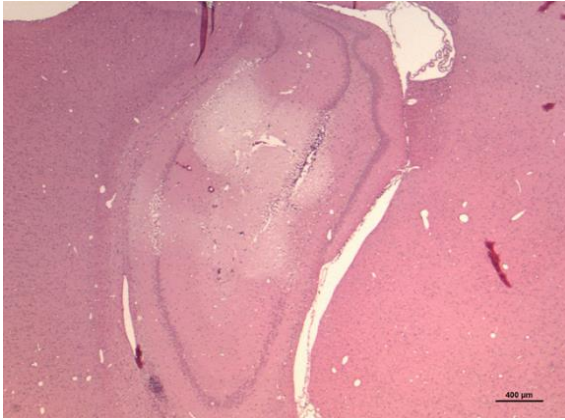


Abb. 7. Fokale Ischämie in Gruppe SAB + Argon (HE-Färbung) (Bild aus dem Institut der Neuropathologie Universitätsmedizin Mainz)

Zur Färbung der Präparate bezüglich GFAP und Iba1 werden GFAP- bzw Iba1- Primärantikörper verwendet. Den entparaffinierten Hirnschnitten wird der Antikörper appliziert, die Schnitte werden inkubiert, gespült und dann mit einem Polymerdetektor behandelt und erneut gespült. Daraufhin folgt das Dehydrieren und ein Deckgläschen wird angebracht.

Hierzu werden parallel eine positive und negative Gewebekontrolle angelegt, in denen sich die Vorbereitung der Präparation und Fixation gleichen. Kommt es in der positiv- Kontrolle zu keiner adäquaten positiven Färbung oder in der negativ- Kontrolle zu einer spezifischen Färbung gelten die Testergebnisse in gleichem Verfahren als ungültig. Erst dann können im Vergleich nachfolgend pathologische Schlüsse gezogen werden.

Insgesamt zeigten sich sowohl bezüglich der Exprimierung von GFAP als auch von Iba1 kein signifikanter Unterschied innerhalb der vier Gruppen.

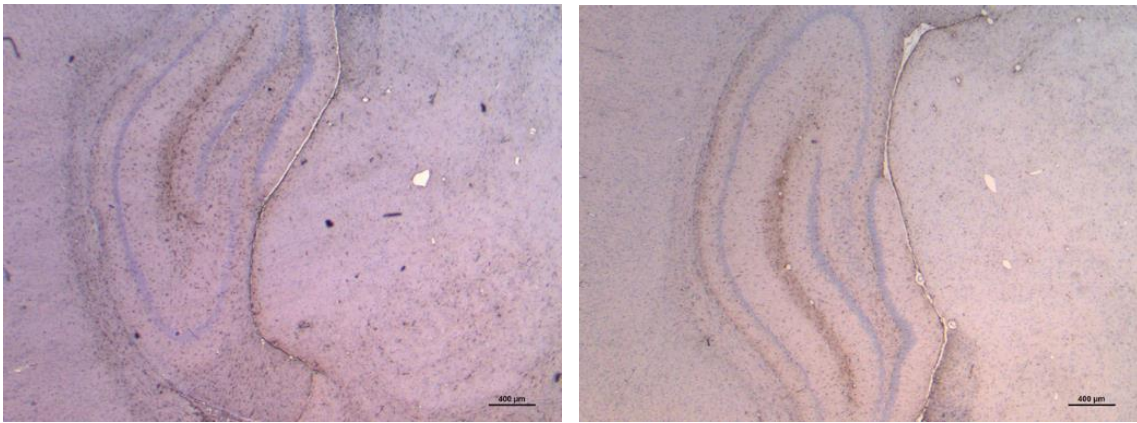


Abb. 8. Exprimierung von GFAP in den mit Argon ventilierten Gruppen (links SAB + Argon; rechts Sham + Argon); kein signifikanter Unterschied (Bilder aus dem Institut der Neuropathologie Universitätsmedizin Mainz)

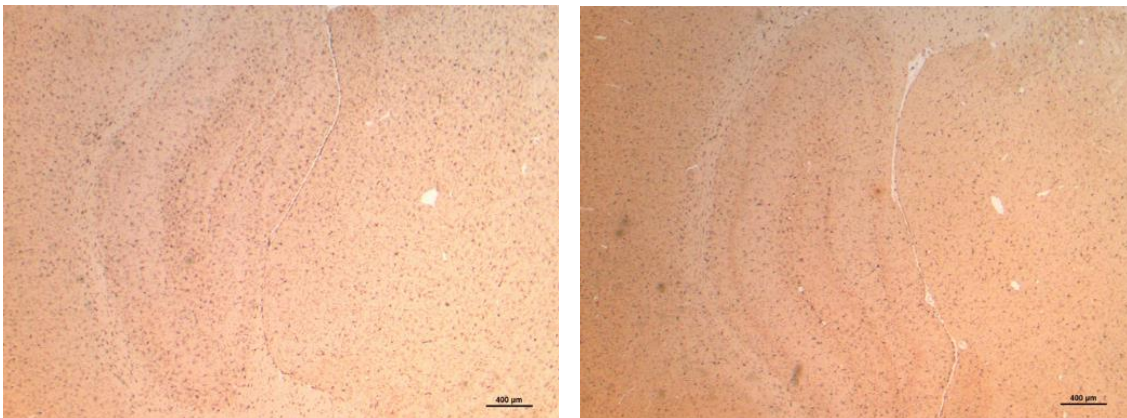


Abb. 9. Exprimierung von Iba1 in den mit Argon ventilierten Gruppen (links SAB + Argon; rechts Sham + Argon); kein signifikanter Unterschied (Bilder aus dem Institut der Neuropathologie Universitätsmedizin Mainz)

Morphologie der A. basilaris

Der Gefäßdurchmesser der A. basilaris zeigte in der SAB(+) Argon Gruppe eine Länge von $189.1 \mu\text{m} \pm 67.1 \mu\text{m}$ (SEM), in der SAB(-) Gruppe $306.4 \mu\text{m} \pm 97.9 \mu\text{m}$ (SEM), in der Sham(+) Argon Gruppe $199.3 \mu\text{m} \pm 53.9 \mu\text{m}$ (SEM) und in der Sham(-)Argon Gruppe eine Länge von $278.9 \mu\text{m} \pm 38.9 \mu\text{m}$ (SEM). Hieraus resultieren signifikant kleinerer Gefäßdurchmesser in beiden Versuchsgruppen mit Argonventilation ($p = 0,0117$ ANOVA).

Bezüglich der Gefäßwanddicke zeigte sich in der SAB(+) Gruppe eine Dicke von $15.2 \mu\text{m} \pm 6.3 \mu\text{m}$ (SEM), in der SAB(-) Argon Gruppe $14.0 \mu\text{m} \pm 2.1 \mu\text{m}$ (SEM), der Sham (+) Argon Gruppe $12.8 \mu\text{m} \pm 2.0 \mu\text{m}$ (SEM) und in der Sham(-) Argon Gruppe

eine Dicke von $13.8 \mu\text{m} \pm 2.5 \mu\text{m}$ (SEM). Insgesamt ergab sich hieraus kein signifikanter Unterschied der Gefäßwanddicke innerhalb der Versuchsgruppen ($p = 0,5648$ ANOVA).

Die Durchflussfläche der einzelnen Aa. basillares beliefen sich im jeweiligen Mittel auf $51303 \mu\text{m}^2 \pm 17610 \mu\text{m}^2$ (SEM) in der SAB(+) Argon Gruppe, auf $103249 \mu\text{m}^2 \pm 57451 \mu\text{m}^2$ in der SAB(-) Argon Gruppe, auf $54915 \mu\text{m}^2 \pm 13311 \mu\text{m}^2$ in der Sham (+) Argon Gruppe und auf $117934 \mu\text{m}^2 \pm 65825 \mu\text{m}^2$ in Sham(-) Argon Gruppe. Dies ergab damit eine signifikant kleinere Fläche ($p = 0,0021$ ANOVA) in den beiden Argon-Gruppen.

Vergleicht man nun auch das Verhältnis der Gefäßdurchmesser zur Gefäßwanddicke ergibt sich kein signifikanter Unterschied in den Argon-ventilierten Gruppen zu den unventilierten Gruppen ($p = 0,1044$ ANOVA).

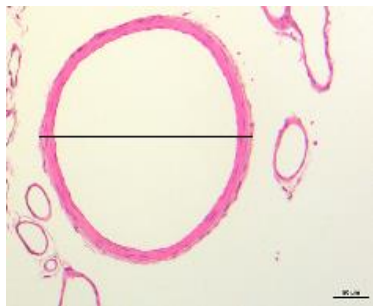


Abb. 10.
Basilararteriendurchmesser



Abb. 11.
Basilararterienwanddicke



Abb. 12.
Gefäßdurchflussfläche

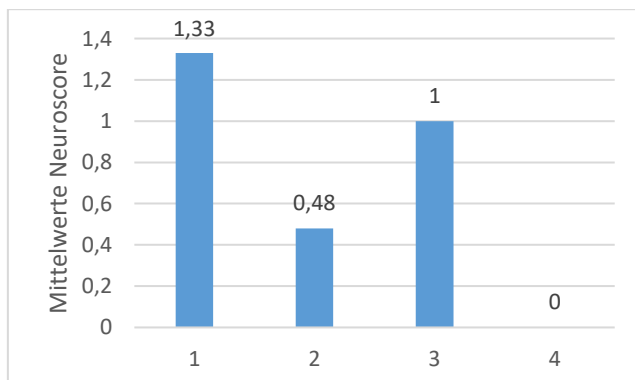
(Bilder aus dem Institut der Neuropathologie Universitätsmedizin Mainz)

	SAB(+) Argon (n= 10)	SAB(-) Argon (n= 4)	Sham(+) Argon (n= 13)	Sham(-) Argon (n= 3)	P-Wert
Gefäßdurchmesser in µm	189.1 ± 67.1	306.4 ± 97.9	199.3 ± 53.9	278.9 ± 38.9	0.0117
Gefäßwanddicke in µm	15.2 ± 6.3	14.0 ± 2.1	12.8 ± 2.0	13.8 ± 2.5	0.5648 → n.s.
Gefäßdurchflussfläche in µm ²	51303 ± 17610	103249 ± 57451	54915 ± 13311	117934 ± 65825	0.0021
Verhältnis Gefäßdurchmesser zu Gefäßwanddicke	14,3 ± 5,7	22,5 ± 8,2	16,2 ± 5,5	20,9 ± 6,7	0,1044 → n.s.

Tab. 9. ANOVA 1-way Auswertung der Gefäßdurchmesser/ Gefäßwanddicke/ Gefäßdurchflussfläche/ Verhältnis Gefäßdurchmesser zu Gefäßwanddicke mit Standartabweichung im Überblick.

Neuroscore

In allen Gruppen zeigten die Versuchstiere präoperativ keine neurologischen Defizite und dementsprechend ein Neuroscore-Wert von 0 Punkten. Aus der SAB(+) Argon Gruppe (1) konnte von 18 Tieren ein postoperativer Neuroscore erhoben werden, deren Mittelwert sich auf 1,33 beläuft. In der SAB(-) Argon Gruppe (3) belief sich die Testung auf 6 Tiere mit Mittelwert von 1,0. Von der Sham(+) Argon (2) Gruppe konnte von 21 Tieren ein postoperativer Wert eruiert werden mit Mittelwert von 0,57 und in der Sham(-) Argon (4) wurden alle 3 Tiere einem neuroscore unterzogen mit einem Mittelwert von 0,0.



Dia. 9. Postoperative Mittelwerte im Neuroscore

ANOVA

Neuroscore

	Quadratsumme	df	Mittel der Quadrate	F	Sig.
Zwischen Gruppen	9,429	3	3,143	1,038	,385
Innerhalb der Gruppen	133,238	44	3,028		
Gesamtsumme	142,667	47			

Tab. 10. ANOVA 1-way Statistische Auswertung des postoperativen Neuroscores.

Insgesamt ergab sich kein signifikanter Unterschied im Vergleich der vier Gruppen ($p= 0,385$).

5. Diskussion

Untersucht wurde die neuroprotektive Wirkung von Argon anhand des mittleren arteriellen Blutdrucks, der regionalen zerebralen Perfusion, der prä- und postoperativen Klinik der Versuchstiere im Neuroscoring und der Expression von GFAP und Iba1 in vier Versuchsgruppen, davon zwei Kontrollgruppen. Deutlich eindrücklich war eine Mortalitätsrate von 37,84 % unter allen Tieren 12 Stunden postinterventionell mit durch das EVP-Modell durchgeführte SAB-Provokation. Insgesamt zeigte sich in allen genannten Parametern kein signifikanter Unterschied in den Versuchsgruppen in Bezug auf eine Argonventilation.

Zusätzlich wurde ein Vergleich der Gefäßmorphologie der Aa. basiliares in den einzelnen Versuchsgruppen durchgeführt, in dem sich eine signifikant kleinere Gefäßdurchflussfläche und signifikant kleinerer Gefäßdurchmesser in den mit Argon ventilierten SAB-Gruppen zeigten. Diese Ergebnisse erbringen den dringenden Verdacht auf einen vorzeitig auftretenden Vasospasmus und ein damit einhergehendes schlechteres Outcome unter Argonventilation. Dazu passend zeigte sich bei 3 Tieren (23,0%) lediglich der SAB(+) Argon Gruppe histomorphologisch eine fokale Ischämie. Dagegen spricht ein ausbleibend signifikanter Unterschied des postoperativen Neuroscores.

Auswertungen zerebrale regionale Perfusion und mittlerer arterieller Blutdruck

Um bei steigendem intrazerebralem Druck einen adäquaten zerebralen Perfusionsdruck zu erhalten kommt es eigentlich im Rahmen der zerebralen Autoregulation zu einer Erhöhung des mittleren arteriellen Drucks. Nach Conzen et al ist ein schneller ICP-Anstieg mit einer ausgeprägten und frühen, aber anhaltenden Störung der zerebralen Autoregulation verbunden (82). Eine direkte ICP-Messung war in unserem Setting nicht möglich, daher ist dieser Faktor nicht repräsentiert.

In unseren Untersuchungen zeigte sich in der SAB(+) Argon-, der SAB(-) Argon- und Sham(+) Gruppe eine signifikante Blutdrucksenkung im Verlauf des Experiments, die sich in den Gruppen untereinander jedoch nicht signifikant unterschied. Ein Vergleich zur Sham(-) Gruppe blieb aus, da die Messungen des Blutdrucks nur bei einem Tier gelang und ein Vergleich mit n = 1 nicht valide ist. Insgesamt wird unsererseits somit

angenommen, dass die zerebrale Autoregulation ausbleibt und nicht durch Ventilation mit Argon positiv beeinflusst wird. Ein möglicher anderer Faktor für eine Blutdrucksenkung ist die Narkose, die in unserem Fall mit Ketanest und Isofluran eingeleitet wurde. Lee et al beschreibt in Untersuchungen eine Barorezeptoren unterdrückende Wirkung von Isofluran über das sympathische Nervensystem. Somit kann es zu einer Unterdrückung eines reflektorischen Blutdruck- und Herzfrequenzanstiegs kommen, die wiederum die Versuchsergebnisse beeinträchtigen können (83).

In Bezug auf eine Wirkung inerter Gase auf die regionale zerebrale Perfusion ergaben verschiedene Studien Ansätze die eine Wirkweise von Argon wider-, die von Xenon jedoch belegen. Beispielsweise wird in tierexperimentellen Studien von Schmidt et al beschrieben, dass unter therapeutischer Anwendung des Edelgases Xenon in Schweinen ein signifikanter Anstieg der regionalen Perfusion im Hirnstamm, der Großhirnrinde, der Medulla oblongata und im Kleinhirn ohne zusätzlichen Anstieg in weiteren Organen detektiert werden konnte (84). Eine Wirkung inerter Gase auf die zerebrale Perfusion im Tiermodell steht somit fest. Dem entgegen zeigte Grüne et al 2017 in am (hier männlichen) Menschen durchgeführten Untersuchungen, dass das Edelgas Argon unter anderem weder Einfluss auf die zerebrale Perfusion noch auf den mittleren arteriellen Druck oder den Hirnperfusionsdruck hat (85). In unseren Untersuchungen ergaben sich hierzu passend keine signifikanten Unterschiede der regionalen zerebralen Perfusion nach Argonventilation.

Untersuchungen bezüglich der regionalen zerebralen Perfusion unabhängig der Wirkung inerter Gase wurden bspw. von Schubert et al an Patienten und von Westermaier et al in Tierversuche vorgenommen. Insgesamt ergab sich hier neben einem ICP-Anstieg eine signifikante Reduktion des regionalen zerebralen Blutflusses und zerebralen Perfusionsdrucks (86, 87). Wie bisher schon beschrieben konnten wir diese Ergebnisse auch in den Kontrollgruppen nicht belegen. Fraglich bleibt hier, ob im Allgemeinen die Anbringung der Laserdopplersonde suffizient war. Jedoch ist auch zu beachten, dass die Laserdopplermessung in unserem Setting nur eine unilaterale regionale und kortikale Perfusionsmessung erlaubte und damit neben Messungen der Gegenseite auch intraparenchymale Änderungen der Perfusion nicht

erfasst werden. Westermaier et al beispielsweise nahmen vergleichend eine bilaterale kortikale Messung des regionalen zerebralen Blutflusses vor (87).

Ein weiter aufkommender Aspekt ist die Frage nach der Verteilung des Edelgases Argon im Hirngewebe und damit die einhergehende mögliche Beeinflussung dessen Wirkung. Eine direkte Messung von Argonmolekülen oder dessen Konzentration in Hirngewebe wurde bisher noch nicht beschrieben. Sanders et al berichtet in seinen vergleichenden Untersuchungen jedoch dass sich inerte Gase aufgrund der ungeladenen und unpolaren Eigenschaften leicht im Gehirn verteilen und sich gut in amphiphile Bindungshohlräume innerhalb von Proteinen eingliedern können (54, 88). Nach Studien von Ohta et al zufolge ist die Speicherung und/oder Freisetzung von Inertgas aus Körperspeichern durch Perfusion bestimmt. Ohne genannte signifikante Änderung der zerebralen Perfusion ist aus diesem Gesichtspunkt davon auszugehen, dass kein verändertes zerebrales Angebot des Edelgases in den mit Argon ventilierten Gruppen vorherrscht (89).

Da die Tiere narkotisiert, jedoch nicht intubiert wurden und spontan weiter atmeten war eine unzureichende Oxygenierung während des experimentellen Eingriffs nicht auszuschließen. Neben dem bekannten Umstand dass eine Hypoxie zu neuronalen Schäden führen kann, beschreibt Lopez et al auch eine potenzielle schädliche Rolle der zerebralen Hyperoxygenierung, die wiederum einen negativen Einfluss auf das neurologische Outcome haben könnte (90). Um einen Überblick der Oxygenierung zu erhalten wurden stichprobenartig BGA- Analysen arteriellen Blutes der Tiere vor und nach Argon-Ventilation durchgeführt. Das Blut wurde hierfür aus der Schwanzarterie gewonnen, in der die Blutdrucksonde einlag. Vor Ventilation zeigte sich in allen Gruppen postinterventionell ein normwertiger Sauerstoffpartialdruck zwischen 80 und 110 mmHg. Nach Ventilation blieb dieser bis auf insgesamt zwei Ausnahmen weiterhin im Normbereich. Dieses Ergebnis schließt jedoch weder eine intrainerventionell passagere Hypoxigenierung oder passagere Hyperoxygenierung/en während der Ventilation aus.

Auswertung Gefäßmorphologie

Yang et al untersuchten 2018 im SAB-Rattenmodell die aufkommenden Veränderungen nach SAB-Provokation bezüglich der Gefäßmorphologie der A.

basilaris. Es wurden SAB-Tiere sowohl scheinoperierten und nicht operierten Tieren gegenübergestellt und postinterventionell nach insgesamt 7 Tagen der Gefäßdurchmesser und die Gefäßdurchflussfläche des A. basilaris verglichen. In der Auswertung zeigten sich beide Parameter in der SAB-Gruppe signifikant verringert (91). Unsere histomorphologische Auswertung ergab sowohl ein signifikant kleinerer Gefäßdurchmesser als auch kleinere Durchflussfläche in den mit Argon ventilierten Gruppen, beide Ergebnisse ohne zusätzlich signifikanten Unterschied zur Gefäßwanddicke. Dies hätte nach dem Gesetz von Hagen-Poiseuille und mit Sicht auf den Volumenstrom zur Folge, dass ein erhöhter Gefäßwiderstand entsteht und insgesamt ohne autoregulativen Ausgleich ein vermindertes Blutvolumen pro Zeiteinheit den gemessenen Gefäßabschnitt passieren würde. Hierzu passend fanden sich bei 23,0 % der ventilierten SAB-Gruppe fokale Ischämien, ohne dass diese auch in anderen Gruppen zu finden waren. Verglichen zu den genannten Studien von Yang et al zeigte unsere SAB(-)Argon-Gruppe die den Versuchstieren von Yang et al entsprechen würden keine Gefäßmorphologischen Veränderungen 12 Stunden nach SAB-Provokation. Hier steht besonders die zeitliche Diskrepanz im Vordergrund. Allerdings zeigte unsere SAB(+) Argon Gruppe dieselben Ergebnisse wie die Hauptversuchsgruppe von Yang et al bereits 12-24 Stunden nach SAB-Provokation und unter Argonventilation. Dies hebt hervor, dass unseren Untersuchungen zufolge die Inhalation mit Argon einen insgesamt nachteiligen Effekt auf die Gefäßmorphologie mit sich bringt.

Expression von GFAP und Iba1

Zur Kontrolle einer molekularen Reaktion des Hirngewebes auf Argon entschieden wir uns für die Expression von GFAP, als Zeichen der Astrozytenaktivität, sowie Iba1 zur Objektivierung einer Mikrogliaaktivität. Wie bereits erwähnt gibt es mittlerweile publizierte Studien, wie die von Höllig et al, in denen die Expression von Parametern innerhalb des schon beschriebenen Argonwirkungsmechanismus gemessen und verglichen wurden, während in unseren Experimenten lediglich genannte indirekte Parameter als Korrelat von ZNS-Verletzungen und Neurodegeneration verglichen wurden (70). Somit ist zu betonen, dass unsere Ergebnisse und deren Auswertung bezüglich einer Neuroprotektion auf immunhistochemischer Ebene als nur richtungsweisend und nicht als vollständig ausreichend anzusehen sind.

Da eine SAB durch verschiedene Umstände wie beispielsweise dem Vasospasmus mit der Komplikation einer Ischämie einhergehen kann betrachten wir in der Diskussion auch Studien die sich im Besonderen mit der neuroprotektiven Wirkung von Argon bei zerebralen Ischämien beschäftigen. In Studien von Liu et al konnte nach Argonventilation eine signifikante Unterdrückung der Mikroglia- und Makrophagen- Aktivierung als Zeichen einer geringeren postischämischen Entzündungsreaktion durch verminderten Nachweis von Iba1 in der Penumbra von zerebralen Ischämien dargestellt hier ohne signifikanten Unterschied in den Gruppen. In unseren Ergebnissen zeigten jedoch auch die 23 % mit einer Ischämie einhergehenden Tiere der SAB(+) Argon Gruppe keine signifikanten Unterschied der GFAP und Iba1 Expression.

Nach Studien von Kooijman et al ist eine GFAP (Astrozyten)- und Iba- (Mikroglia / Makrophagen) Expression als etablierte Marker für die Neuroinflammation nach SAB stark mit dem Schweregrad der SAB verbunden (92). In unseren Untersuchungen ergaben sich jedoch keine signifikanten Unterschiede in den einzelnen Gruppen bezüglich der Expression beider Parameter 12 bis 24 Stunden sowohl nach Argon-Ventilation als auch in den Kontrollgruppen und das obwohl jegliche Blutungsausprägungen repräsentiert waren (siehe Abb. 6 und Tab. 5, S. 32). Ein dem unseren sehr ähnliches Ergebnis erbrachte eine Studie von Fahlencamp et al, die in einem in-vivo-Modell einen passageren Verschluss der mittleren Hirnarterie induzierten und die Auswirkungen von Argon auf die aufkommende zerebrale Ischämie untersuchten. Die verwendete Argonkonzentration (50:50 zu Sauerstoff) und Ventilationsdauer (60 Minuten) entsprachen denen unseres Settings (93).

Im Allgemeinen kommt unter anderem die Frage auf ab wann eine Expression von Iba1 und GFAP überhaupt physiologisch eingeleitet wird und messbar ist. Laut Studien von Lee et al wurde bereits 12 Stunden nach induziertem Trauma am Rattenhirn eine vermehrte Expression von GFAP nachgewiesen und in Untersuchungen von Shtaya zeigte sich nach 24 Stunden bereits eine dreifache Konzentration von Iba1 nach ICH-Provokation (80, 94). Der zeitliche Aspekt ist in unserem Protokoll mit Hirnentnahme 24 Stunden nach Argon-Ventilation festgelegt worden und wäre somit eingehalten. In den meisten Fällen mussten die Tiere jedoch verfrüht (12 Stunden nach Argon-Ventilation) mit Phosphat-Puffer perfundiert werden da sich ihr klinischer Zustand rapide verschlechterte und drohten vor Erreichen des

24 Stunden - Intervalls zu versterben. Dies legt damit den Verdacht nahe, dass die Expression von GFAP und Iba1 aus zeitlichen Gründen in unserem Setting nicht adäquat erfasst werden konnte. Dem entgegen stehen jedoch die schon erwähnten gleichen Ergebnisse von Fahlenkamp et al, deren Auswertung mit der Hirnentnahme nach eingehaltenen 24 Stunden eingeleitet wurde (93).

Da die anfängliche Aktivierung der Mikroglia bei zerebralen Ischämien auf eine Störung der Blut-Hirn-Schranke zurückgeführt wird, konzentrieren sich viele Untersuchungen bezüglich der Neuroprotektion durch Argon auf die ischämische Grenzzone, die in unserem Setting nicht im Vordergrund steht. Hier wird die Konzentration des exprimierten Iba1 als einer der ausschlaggebenden Werte genutzt (68, 95). Fraglich ist hier also ob die Expression im Besonderen von Iba1 in unserem Model eine große Aussagekraft hat, da hier die Ischämie als Komplikation einer SAB und nicht als induziertes Untersuchungskorrelat behandelt wird.

Kritik am EVP-Tiermodell

Obwohl das EVP-Modell als eines der aussagekräftigsten Modelle im Bezug seiner Aussagekraft der Relevanz für den Menschen darstellt, bringt es auch Nachteile mit sich.

Aufgrund einer erhöhten Komplexität des experimentellen Settings geht das EVP-Modell mit einer erheblichen Mortalitätsrate von ca. 44 – 46 % nach Prunell et al und Park et al einher (71, 96, 97). Auch in unserem Fall zeigte sich eine hohe Mortalitätsrate aller dem EVP-Modell unterzogenen SAB-Tiere von 37,84 % innerhalb der 24 Stunden nach Ventilation. Es kam damit bei manchen Tieren aufgrund einer rasanten Verschlechterung des Allgemeinzustandes zu einer vorzeitigen Phosphatpuffer-Perfusion (vor Ablauf der 24 Stunden nach Argon-Ventilation) um zumindest eine adäquate Konservierung der Hirne zu erreichen. Nicht dazu passend erschien die Ausprägung des Grades der Hirnblutung der überlebenden Tiere, wovon 44,4% der SAB(+)Argon Gruppe und 40,0% der SAB(-)Argon Gruppe lediglich Grad I und nur jeweils 16,7% bzw. 30,0% Grad III zeigten. Dies führt zur Annahme, dass die hohe Mortalität multifaktorieller Genese entspringt und nicht allein das Ausmaß der ausgelösten Hirnblutung zu dieser führt.

Ein weiterer wichtiger Aspekt des EVP-Modells ist, dass die Perforation der ICA-Bifurkation blind erfolgt. Der Operateur leitet sich rein durch das Gefühl eines nachgebenden Widerstandes, ohne direktes Feedback. Ein indirekter Marker wäre ein steigender ICP, der jedoch nicht zwangsläufig zu detektieren ist. Dies kann dazu führen, dass eine wiederholte Penetration der Arterie und ggfs. auch eine direkte Verletzung des Hirngewebes und/oder eine subdurale Blutung zustande kommen kann und damit ein größeres Trauma wie eigentlich erwünscht verursacht wird (96, 98). Park et al entwickelte hierzu verschiedene Vorgehensweisen und Techniken um der im EVP-Modell mit subduralem Hämatom einhergehender steigenden Mortalität entgegen zu wirken (96). In unserem Modell war eine direkte ICP-Messung nicht möglich, somit war die Gefahr für genanntes Problem erhöht. In der makroskopischen Begutachtung konnte eine intraventrikuläre Blutung bei 61,7 % der SAB-Gruppe mit Argonventilation und bei 66,7 % der SAB-Gruppe ohne Argonventilation festgestellt werden. Desweiteren zeigte sich eine intraparenchymale Blutung bei 80,0 % in der SAB-Gruppe mit Argonventilation und 20,0 % in der SAB-Gruppe ohne Argonventilation.

Der Schweregrad einer SAB ist wie schon beschrieben von einem ICP-Spitzenanstieg und dem raumfordernden Volumen des Blutes im Subarachnoidalraum abhängig. Westermaier et al beschreibt eine Korrelation zwischen der genutzten Filamentgröße im EVP-Modell und ICP, sowie CPP. Mit zunehmender Größe des Filaments zeigt sich die Zunahme des ICP und die Abnahme des CPP nämlich stärker ausgeprägt (87). Nicht mit eingeschlossen ist die Ausprägung der Blutung selbst. Durch weitgehend unkontrollierte Perforation der ICA-Bifurkation ist eine Reproduzierbarkeit besagter Ausprägung daher sehr schlecht. Dementsprechend kam es auch in unseren Experimenten zur Provokation verschiedenster SAB-Grade mit unregelmäßiger Verteilung (s. Abb 6 und Tab. 5).

Um im Speziellen einen Vasospasmus nach einer SAB zu untersuchen wird oftmals nicht das EVP-Modell sondern das sogenannte Doppelinjektionsmodell verwendet. Wie bereits erwähnt haben jedoch einzelne Studien gezeigt, dass sich ein Vasospasmus im EVP-Modell vergleichsweise früher entwickelt, ca. 24 Stunden nach Perforation. Da in unserem Setting die Hirnentnahme meist vor Ablauf der 24 Stunden postinterventionell stattfand ist es durchaus möglich, dass der Nachweis von Vasospasmen in Form der einzelnen oben beschriebenen Messungen der Aa.

basilares zeitlich zu früh stattfand und die Nachweise fälschlich in der Gesamtsumme als zu niedrig detektiert wurden.

Insgesamt werden tierexperimentelle Studien fast ausschließlich an nur einem Tierstamm mit jeweilig gleichem Geschlecht durchgeführt. Grund dafür sind im Allgemeinen Unterschiede in u. a. der Intensität einer Blutung, von anatomischen Gegebenheiten und hormoneller Einwirkungen (71). Das führt dazu dass die Ergebnislagen solcher Studien nicht für die Allgemeinheit geltend gemacht werden können und spricht schlussendlich generell für die Notwendigkeit die experimentellen Ansätze mit mehreren Tierstämmen und beiden Geschlechtern durchzuführen und diese in einen Vergleich zu setzen um aussagekräftigere Ergebnisse zu erzielen.

Die inhalative Argonkonzentration in Bezug auf fokale zerebrale Ischämien und auf das neurologische Outcome

Wir verwendeten in unseren Experimenten eine 50%ige Argonkonzentration für die Inhalation der Versuchstiere. Entsprechend Loetscher et al ist diese als die Konzentration mit bestem neuroprotektivem Potential beschrieben (69). Auch durch Ryang et al wurde festgestellt, dass mit Ventilation von 50%iger Argon-Konzentration bestimmte positive Effekte zu eruieren waren, beispielsweise ein deutlich vermindertes Infarktvolumen nach passagerer Okklusion der MCA (99). David et al kam auf dasselbe Ergebnis, jedoch nur bei Tieren, die vor oder während der provozierten Ischämie eine Inhalation mit Argon erfuhren. Fand die Inhalation postischämisch statt zeigte sich nach durch Okklusion der MCA provozierte intrazerebrale Ischämie sogar eine größere zerebrale Schädigung (100). In beiden genannten Studien ergab sich neurologisch kein verbessertes Outcome, das mit unseren Ergebnissen in denen sich kein signifikanter Unterschied im Neuroscore der Gruppen untereinander zeigte korreliert. Ischämien zeigten sich auch in unseren Untersuchungen, diese allerdings nur in 23,0 % der SAB(+) Argon Gruppe. Wie schon erwähnt mussten aufgrund der hohen Mortalitätsrate und rapider Verschlechterung der Klinik in manchen Fällen die Tiere verfrüht (12 Stunden nach Argon-Ventilation) mit Phosphat-Puffer perfundiert werden. Somit konnte eine spät aufkommende Ischämie nach SAB und eine Beeinflussung einer neuroprotektiven Wirkung durch Argon nicht ausgeschlossen bzw. detektiert werden. Die betroffenen ischämischen Hirnregionen wurden jedoch nicht in ihrem Infarktvolumen gemessen

und verglichen, somit kann eine Beeinflussung von Argon auf das Infarktvolumen nicht bewiesen oder ausgeschlossen werden. Zudem fand bei uns keine induzierte Okklusion sondern eine Ischämie im Zusammenhang mit einer SAB statt, wie genau sich der Hergang ereignet ist unklar, jedoch fanden wir den Hinweis für einen Zusammenhang mit einem frühzeitig auftretenden Vasospasmus.

Genannten Studienergebnissen die Argonkonzentration betreffend gegenüber steht eine Studie von Ma et al, die 2019 in Untersuchungen mit Inhalation von 70%igem Argon zeigte, dass sich hierunter sowohl das neurologische Outcome, die allgemeine Erholung und das Infarktvolumen bei direkter Anwendung postischämisch als signifikant verbessert zeigten. Das neurologische Outcome und die körperliche Erholung der Versuchstiere konnten auch nach 2 stündig postischämisch verzögertem Beginn mit der Argonventilation oder sogar mit Ventilation erst nach Reperfusion nachgewiesen werden (101). Demzufolge scheint das Wiederholen unserer Experimente mit höherer Argonkonzentration und zusätzlichem Einschluss der Evaluation von Ischämievolumina vielversprechend.

Neuroscore

Bezüglich des neurologischen Outcomes zeigte sich in unseren Untersuchungen, wie auch in Studien von Höllig et al kein signifikanter Unterschied in den Versuchsgruppen, auch im Hinblick auf die Tatsache, dass alle Ausprägungen einer SAB vertreten waren (70). Dem entgegensetzen sind die Ergebnisse von Kooijman et al, in denen der Grad der Blutung stark mit dem akuten neurologischen Score korreliert (92). Hier nochmalig zu nennen ist die mit dem Modell einhergehende hohe Mortalität, unter dieser viele Tiere aufgrund verfrühten Todes gar nicht erst einem postoperativen Neuroscoring unterzogen werden konnten und somit aus der Wertung fallen. Insgesamt muss also angenommen werden, dass eine Korrelation zwischen dem Blutungsrad und dem neurologischen Outcome auch in unserem Setting nicht auszuschließen ist.

6. Zusammenfassung

Die SAB stellt einen medizinischen Notfall dar, betrifft eher die jüngere Population und geht mit einer erheblichen Morbidität und Mortalität einher. Immer mehr rückt die Neuroprotektion in den Vordergrund einer unterstützenden Maßnahme schon bestehender Therapieoptionen von Hirnblutungen und Schädel-Hirn-Traumen. Hier wurde bereits eine neuroprotektive Wirkung des Edelgases Xenon nachgewiesen. Da dieses sehr selten vorkommt wird an Alternativen der Nutzung inerter Gase geforscht, unter anderem auch Argon.

In unseren Untersuchungen wurde die neuroprotektive Wirkung des Edelgases Argon während einer akuten Subarachnoidalblutung im Rattenmodell im Speziellen im EVP-Modell vorgenommen.

Insgesamt konnten wir keine neuroprotektive Wirkung des Edelgases Argon in Bezug auf mittleren arteriellen Blutdruck, regionaler cerebraler Perfusion, neurologisches Outcome und Expression von GFAP und Iba1 feststellen. Histomorphologisch fanden wir eher einen nachteiligen Effekt in Bezug auf die Gefäßmorphologie nach inhalativer Anwendung des Gases nach akuter SAB.

7. Literaturverzeichnis

1. Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie, Deutsche Gesellschaft für Neurologie (DGN). S1-Leitlinie: Subarachnoidalblutung; Stand September 2017 mit Verlängerung bis 29.09.2017 [zitiert am 20.11.2017] ; Federführend Prof. Dr. Helmuth Steinmetz, Frankfurt am Main; AWMF-Registernummer: 030/073; URL: https://www.dgn.org/images/red_leitlinien/LL_2012/pdf/030-073l_S1_Subarachnoidalblutung_2012_verlaengert.pdf
2. Teunissen LL, Rinkel GJ, Algra A, van Gijn J. Risk factors for subarachnoid hemorrhage: a systematic review. *Stroke*. 1996;27(3):544-9.
3. Bederson JB, Connolly ES, Jr., Batjer HH, Dacey RG, Dion JE, Diringer MN, et al. Guidelines for the management of aneurysmal subarachnoid hemorrhage: a statement for healthcare professionals from a special writing group of the Stroke Council, American Heart Association. *Stroke*. 2009;40(3):994-1025.
4. Korja M, Silventoinen K, Laatikainen T, Jousilahti P, Salomaa V, Hernesniemi J, et al. Risk factors and their combined effects on the incidence rate of subarachnoid hemorrhage--a population-based cohort study. *PloS one*. 2013;8(9):e73760.
5. Long X, Jingsheng L, Jizong Z. Different Grading Scales for Spontaneous Subarachnoid Hemorrhage and Health-Related Quality Evaluations. *World neurosurgery*. 2013;80(6):808-9.
6. Schattlo B, Fathi AR, Fandino J. Management of aneurysmal subarachnoid haemorrhage. *Swiss medical weekly*. 2014;144:w13934.
7. Connolly ES, Jr., Rabinstein AA, Carhuapoma JR, Derdeyn CP, Dion J, Higashida RT, et al. Guidelines for the management of aneurysmal subarachnoid hemorrhage: a guideline for healthcare professionals from the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke*. 2012;43(6):1711-37.
8. van der Wee N, Rinkel GJ, Hasan D, van Gijn J. Detection of subarachnoid haemorrhage on early CT: is lumbar puncture still needed after a negative scan? *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*. 1995;58(3):357-9.
9. Edlow JA, Caplan LR. Avoiding pitfalls in the diagnosis of subarachnoid hemorrhage. *The New England journal of medicine*. 2000;342(1):29-36.
10. Aggarwal A, Dhandapani S, Praneeth K, Sodhi HBS, Pal SS, Gaudihalli S, et al. Comparative evaluation of H&H and WFNS grading scales with modified H&H (sans systemic disease): A study on 1000 patients with subarachnoid hemorrhage. *Neurosurgical review*. 2018;41(1):241-7.
11. de Souza ML, Vieira AC, Andrade G, Quinino S, de Fatima Leal Griz M, Azevedo-Filho HR. Fisher Grading Scale Associated with Language Disorders in Patients with Anterior Circulation Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage. *World neurosurgery*. 2015;84(2):308-13.
12. Kapapa T, Tjahjadi M, König R, Wirtz CR, Woischneck D. Which Clinical Variable Influences Health-Related Quality of Life the Most After Spontaneous Subarachnoid Hemorrhage? Hunt and Hess Scale, Fisher Score, World Federation of Neurosurgeons Score, Brussels Coma Score, and Glasgow Coma Score Compared. *World neurosurgery*. 2013;80(6):853-8.
13. de Oliveira Manoel AL, Goffi A, Marotta TR, Schweizer TA, Abrahamson S, Macdonald RL. The critical care management of poor-grade subarachnoid haemorrhage. *Critical care (London, England)*. 2016;20:21.

14. Al-Khindi T, Macdonald RL, Schweizer TA. Cognitive and functional outcome after aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Stroke*. 2010;41(8):e519-36.
15. Robbert M, 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*. 2014;261(3):473-9.
16. Daniere F, Gascou G, Menjot de Champfleury N, Machi P, Leboucq N, Riquelme C, et al. Complications and follow up of subarachnoid hemorrhages. *Diagnostic and interventional imaging*. 2015;96(7-8):677-86.
17. Citirik M, Tekin K, Teke MY. Terson syndrome with persistent vitreous hemorrhage following traumatic brain injury. *Saudi journal of ophthalmology : official journal of the Saudi Ophthalmological Society*. 2019;33(4):392-7.
18. Helbok R, Schiefecker AJ, Beer R, Dietmann A, Antunes AP, Sohm F, et al. Early brain injury after aneurysmal subarachnoid hemorrhage: a multimodal neuromonitoring study. *Critical care (London, England)*. 2015;19:75.
19. Macdonald RL. Delayed neurological deterioration after subarachnoid haemorrhage. *Nature reviews Neurology*. 2014;10(1):44-58.
20. Schubert GA, Thome C. Cerebral blood flow changes in acute subarachnoid hemorrhage. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library*. 2008;13:1594-603.
21. Lantigua H, Ortega-Gutierrez S, Schmidt JM, Lee K, Badjatia N, Agarwal S, et al. Subarachnoid hemorrhage: who dies, and why? *Critical Care*. 2015;19(1):309.
22. Broderick JP, Brott TG, Duldner JE, Tomsick T, Leach A. Initial and recurrent bleeding are the major causes of death following subarachnoid hemorrhage. *Stroke*. 1994;25(7):1342-7.
23. 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.
24. Connolly F, Schreiber SJ, Leithner C, Bohner G, Vajkoczy P, Valdueza JM. Assessment of intracranial venous blood flow after subarachnoid hemorrhage: a new approach to diagnose vasospasm with transcranial color-coded duplex sonography. *Journal of neurosurgery*. 2018;129(5):1136-42.
25. Rao GS, Muthuchellappan R. Cerebral vasospasm: current understanding. *Current opinion in anaesthesiology*. 2016;29(5):544-51.
26. Wilkins RH. Cerebral vasospasm. *Critical reviews in neurobiology*. 1990;6(1):51-77.
27. Ciurea AV, Palade C, Voinescu D, Nica DA. Subarachnoid hemorrhage and cerebral vasospasm - literature review. *Journal of medicine and life*. 2013;6(2):120-5.
28. Steiner T, Juvela S, Unterberg A, Jung C, Forsting M, Rinkel G. European Stroke Organization guidelines for the management of intracranial aneurysms and subarachnoid haemorrhage. *Cerebrovascular diseases (Basel, Switzerland)*. 2013;35(2):93-112.
29. Yokoya S, Hino A, Goto Y, Oka H. Pros and Cons of Tentative Clipping in Intracranial Aneurysm Surgery: Review of 867 Direct Clippings in Single Institution. *World neurosurgery*. 2018;118:e185-e7.
30. van Dijk JM, Groen RJ, Ter Laan M, Jeltrema JR, Mooij JJ, Metzemaekers JD. Surgical clipping as the preferred treatment for aneurysms of the middle cerebral artery. *Acta neurochirurgica*. 2011;153(11):2111-7.
31. Pancholy SB, Sanghvi KA, Patel TM. Radial artery access technique evaluation trial: randomized comparison of Seldinger versus modified Seldinger technique for arterial access for transradial catheterization. *Catheterization and*

- cardiovascular interventions : official journal of the Society for Cardiac Angiography & Interventions. 2012;80(2):288-91.
32. Almallouhi E, Al Kasab S, Sattur MG, Lena J, Jabbour PM, Sweid A, et al. Incorporation of transradial approach in neuroendovascular procedures: defining benchmarks for rates of complications and conversion to femoral access. *Journal of neurointerventional surgery*. 2020.
33. Shimohira M, Hashizume T, Ohta K, Suzuki K, Kurosaka K, Muto M, et al. Triaxial coil embolization using Guglielmi detachable coils with the voltage-dependent coil-detaching technique. *Acta radiologica (Stockholm, Sweden : 1987)*. 2015;56(1):51-5.
34. Lindgren A, Vergouwen MD, van der Schaaf I, Algra A, Wermer M, Clarke MJ, et al. Endovascular coiling versus neurosurgical clipping for people with aneurysmal subarachnoid haemorrhage. *The Cochrane database of systematic reviews*. 2018;8:Cd003085.
35. Molyneux AJ, Birks J, Clarke A, Sneade M, Kerr RS. The durability of endovascular coiling versus neurosurgical clipping of ruptured cerebral aneurysms: 18 year follow-up of the UK cohort of the International Subarachnoid Aneurysm Trial (ISAT). *Lancet (London, England)*. 2015;385(9969):691-7.
36. Molyneux A, Kerr R, Stratton I, Sandercock P, Clarke M, Shrimpton J, et al. International Subarachnoid Aneurysm Trial (ISAT) of neurosurgical clipping versus endovascular coiling in 2143 patients with ruptured intracranial aneurysms: a randomised trial. *Lancet (London, England)*. 2002;360(9342):1267-74.
37. Kang XK, Guo SF, Lei Y, Wei W, Liu HX, Huang LL, et al. Endovascular coiling versus surgical clipping for the treatment of unruptured cerebral aneurysms: Direct comparison of procedure-related complications. *Medicine*. 2020;99(13):e19654.
38. Nagel A, Graetz D, Schink T, Frieler K, Sakowitz O, Vajkoczy P, et al. Relevance of intracranial hypertension for cerebral metabolism in aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Clinical article. Journal of neurosurgery*. 2009;111(1):94-101.
39. Stevens RD, Huff JS, Duckworth J, Papangelou A, Weingart SD, Smith WS. Emergency neurological life support: intracranial hypertension and herniation. *Neurocritical care*. 2012;17 Suppl 1:S60-5.
40. Coles JP, Fryer TD, Coleman MR, Smielewski P, Gupta AK, Minhas PS, et al. Hyperventilation following head injury: effect on ischemic burden and cerebral oxidative metabolism. *Critical care medicine*. 2007;35(2):568-78.
41. Kelly DF, Goodale DB, Williams J, Herr DL, Chappell ET, Rosner MJ, et al. Propofol in the treatment of moderate and severe head injury: a randomized, prospective double-blinded pilot trial. *Journal of neurosurgery*. 1999;90(6):1042-52.
42. Shiozaki T, Sugimoto H, Taneda M, Yoshida H, Iwai A, Yoshioka T, et al. Effect of mild hypothermia on uncontrollable intracranial hypertension after severe head injury. *Journal of neurosurgery*. 1993;79(3):363-8.
43. Paulson OB, Strandgaard S, Edvinsson L. Cerebral autoregulation. *Cerebrovascular and brain metabolism reviews*. 1990;2(2):161-92.
44. Budohoski KP, Czosnyka M, Kirkpatrick PJ, Smielewski P, Steiner LA, Pickard JD. Clinical relevance of cerebral autoregulation following subarachnoid haemorrhage. *Nature reviews Neurology*. 2013;9(3):152-63.
45. Harrigan MR. Hypertension may be the most important component of hyperdynamic therapy in cerebral vasospasm. *Critical care (London, England)*. 2010;14(3):151.

46. Mayberg MR, Batjer HH, Dacey R, Diringer M, Haley EC, Heros RC, et al. Guidelines for the management of aneurysmal subarachnoid hemorrhage. A statement for healthcare professionals from a special writing group of the Stroke Council, American Heart Association. *Circulation*. 1994;90(5):2592-605.
47. Velat GJ, Kimball MM, Mocco JD, Hoh BL. Vasospasm after aneurysmal subarachnoid hemorrhage: review of randomized controlled trials and meta-analyses in the literature. *World neurosurgery*. 2011;76(5):446-54.
48. Bejjani GK, Bank WO, Olan WJ, Sekhar LN. The efficacy and safety of angioplasty for cerebral vasospasm after subarachnoid hemorrhage. *Neurosurgery*. 1998;42(5):979-86; discussion 86-7.
49. Bracad S, Schmitt E. Vasospasm and delayed consequences. *Interventional neuroradiology : journal of peritherapeutic neuroradiology, surgical procedures and related neurosciences*. 2008;14 Suppl 1:17-22.
50. Wiendl H, Elger C, Forstl H, Hartung HP, Oertel W, Reichmann H, et al. Gaps Between Aims and Achievements in Therapeutic Modification of Neuronal Damage ("Neuroprotection"). *Neurotherapeutics : the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics*. 2015;12(2):449-54.
51. Khriachtchev L, Pettersson M, Runeberg N, Lundell J, Rasanen M. A stable argon compound. *Nature*. 2000;406(6798):874-6.
52. Spaggiari S, Kepp O, Rello-Varona S, Chaba K, Adjemian S, Pype J, et al. Antiapoptotic activity of argon and xenon. *Cell cycle (Georgetown, Tex)*. 2013;12(16):2636-42.
53. Fahlenkamp AV, Rossaint R, Coburn M. [Neuroprotection by noble gases: New developments and insights]. *Der Anaesthetist*. 2015;64(11):855-8.
54. Sanders RD, Ma D, Maze M. Argon neuroprotection. *Critical care (London, England)*. 2010;14(1):117.
55. Harris K, Armstrong SP, Campos-Pires R, Kiru L, Franks NP, Dickinson R. Neuroprotection against traumatic brain injury by xenon, but not argon, is mediated by inhibition at the N-methyl-D-aspartate receptor glycine site. *Anesthesiology*. 2013;119(5):1137-48.
56. Jawad N, Rizvi M, Gu J, Adeyi O, Tao G, Maze M, et al. Neuroprotection (and lack of neuroprotection) afforded by a series of noble gases in an in vitro model of neuronal injury. *Neuroscience letters*. 2009;460(3):232-6.
57. Coburn M, Maze M, Franks NP. The neuroprotective effects of xenon and helium in an in vitro model of traumatic brain injury. *Critical care medicine*. 2008;36(2):588-95.
58. Jordan BD, Wright EL. Xenon as an anesthetic agent. *AANA journal*. 2010;78(5):387-92.
59. Esencan E, Yuksel S, Tosun YB, Robinot A, Solaroglu I, Zhang JH. XENON in medical area: emphasis on neuroprotection in hypoxia and anesthesia. *Medical gas research*. 2013;3(1):4.
60. Sanders RD, Ma D, Maze M. Xenon: elemental anaesthesia in clinical practice. *British medical bulletin*. 2004;71:115-35.
61. Lobo N, Yang B, Rizvi M, Ma D. Hypothermia and xenon: novel noble guardians in hypoxic-ischemic encephalopathy? *Journal of neuroscience research*. 2013;91(4):473-8.
62. Chakkarapani E, Dingley J, Liu X, Hoque N, Aquilina K, Porter H, et al. Xenon enhances hypothermic neuroprotection in asphyxiated newborn pigs. *Annals of neurology*. 2010;68(3):330-41.

63. Ma D, Hossain M, Chow A, Arshad M, Battson RM, Sanders RD, et al. Xenon and hypothermia combine to provide neuroprotection from neonatal asphyxia. *Annals of neurology*. 2005;58(2):182-93.
64. Zhao H, Rossaint R, Coburn M, Ma D. The renoprotective properties of xenon and argon in kidney transplantation. *European journal of anaesthesiology*. 2017;34(10):637-40.
65. Dinse A, Fohr KJ, Georgieff M, Beyer C, Bulling A, Weigt HU. Xenon reduces glutamate-, AMPA-, and kainate-induced membrane currents in cortical neurones. *British journal of anaesthesia*. 2005;94(4):479-85.
66. Ulbrich F, Goebel U. The Molecular Pathway of Argon-Mediated Neuroprotection. *International journal of molecular sciences*. 2016;17(11).
67. Ulbrich F, Kaufmann K, Roesslein M, Wellner F, Auwarter V, Kempf J, et al. Argon Mediates Anti-Apoptotic Signaling and Neuroprotection via Inhibition of Toll-Like Receptor 2 and 4. *PloS one*. 2015;10(12):e0143887.
68. Anna R, Rolf R, Mark C. Update of the organoprotective properties of xenon and argon: from bench to bedside. *Intensive care medicine experimental*. 2020;8(1):11.
69. Loetscher PD, Rossaint J, Rossaint R, Weis J, Fries M, Fahlenkamp A, et al. Argon: neuroprotection in in vitro models of cerebral ischemia and traumatic brain injury. *Critical care (London, England)*. 2009;13(6):R206.
70. Höllig A, Weinandy A, Liu J, Clusmann H, Rossaint R, Coburn M. Beneficial Properties of Argon After Experimental Subarachnoid Hemorrhage: Early Treatment Reduces Mortality and Influences Hippocampal Protein Expression. *Critical care medicine*. 2016;44(7):e520-9.
71. Sehba FA. Rat endovascular perforation model. *Translational stroke research*. 2014;5(6):660-8.
72. Bederson JB, Germano IM, Guarino L. Cortical blood flow and cerebral perfusion pressure in a new noncraniotomy model of subarachnoid hemorrhage in the rat. *Stroke*. 1995;26(6):1086-91; discussion 91-2.
73. Lee JY, Sagher O, Keep R, Hua Y, Xi G. Comparison of experimental rat models of early brain injury after subarachnoid hemorrhage. *Neurosurgery*. 2009;65(2):331-43; discussion 43.
74. Gules I, Satoh M, Clower BR, Nanda A, Zhang JH. Comparison of three rat models of cerebral vasospasm. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology*. 2002;283(6):H2551-9.
75. Jakobsen M, Enevoldsen E, Bjerre P. Cerebral blood flow and metabolism following subarachnoid haemorrhage: cerebral oxygen uptake and global blood flow during the acute period in patients with SAH. *Acta neurologica Scandinavica*. 1990;82(3):174-82.
76. Boyko M, Azab AN, Kuts R, Gruenbaum BF, Gruenbaum SE, Melamed I, et al. The neuro-behavioral profile in rats after subarachnoid hemorrhage. *Brain research*. 2013;1491:109-16.
77. Nedelmann M, Wilhelm-Schwenkmezger T, Alessandri B, Heimann A, Schneider F, Eicke BM, et al. Cerebral embolic ischemia in rats: correlation of stroke severity and functional deficit as important outcome parameter. *Brain research*. 2007;1130(1):188-96.
78. Silverman A, Petersen NH. *Physiology, Cerebral Autoregulation*. StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing

StatPearls Publishing LLC.; 2020.

79. Yang Z, Wang KK. Glial fibrillary acidic protein: from intermediate filament assembly and gliosis to neurobiomarker. *Trends in neurosciences*. 2015;38(6):364-74.
80. Lee HH, Park SC, Choe IS, Kim Y, Ha YS. Time Course and Characteristics of Astrocyte Activation in the Rat Brain after Injury. *Korean journal of neurotrauma*. 2015;11(2):44-51.
81. Ohsawa K, Imai Y, Sasaki Y, Kohsaka S. Microglia/macrophage-specific protein Iba1 binds to fimbrin and enhances its actin-bundling activity. *Journal of neurochemistry*. 2004;88(4):844-56.
82. Conzen C, Becker K, Albanna W, Weiss M, Bach A, Lushina N, et al. The Acute Phase of Experimental Subarachnoid Hemorrhage: Intracranial Pressure Dynamics and Their Effect on Cerebral Blood Flow and Autoregulation. *Translational stroke research*. 2019;10(5):566-82.
83. Lee JS, Morrow D, Andresen MC, Chang KS. Isoflurane depresses baroreflex control of heart rate in decerebrate rats. *Anesthesiology*. 2002;96(5):1214-22.
84. Schmidt M, Marx T, Kotzerke J, Lüderwald S, Armbruster S, Topalidis P, et al. Cerebral and regional organ perfusion in pigs during xenon anaesthesia. *Anaesthesia*. 2001;56(12):1154-9.
85. Grüne F, Kazmaier S, Hoeks SE, Stolker RJ, Coburn M, Weyland A. Argon does not affect cerebral circulation or metabolism in male humans. *PloS one*. 2017;12(2):e0171962.
86. Schubert GA, Seiz M, Hegewald AA, Manville J, Thomé C. Acute hypoperfusion immediately after subarachnoid hemorrhage: a xenon contrast-enhanced CT study. *Journal of neurotrauma*. 2009;26(12):2225-31.
87. 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.
88. Bertaccini EJ, Trudell JR, Franks NP. The common chemical motifs within anesthetic binding sites. *Anesthesia and analgesia*. 2007;104(2):318-24.
89. Ohta Y, Song SH, Groom AC, Farhi LE. Is inert gas washout from the tissues limited by diffusion? *Journal of applied physiology: respiratory, environmental and exercise physiology*. 1978;45(6):903-7.
90. Lopez MG, Pandharipande P, Morse J, Shotwell MS, Milne GL, Pretorius M, et al. Intraoperative cerebral oxygenation, oxidative injury, and delirium following cardiac surgery. *Free radical biology & medicine*. 2017;103:192-8.
91. Yang L, Lai WT, Wu YS, Zhang JA, Zhou XH, Yan J, et al. Simple and efficient rat model for studying delayed cerebral ischemia after subarachnoid hemorrhage. *Journal of neuroscience methods*. 2018;304:146-53.
92. Kooijman E, Nijboer CH, van Velthoven CT, Mol W, Dijkhuizen RM, Kesecioglu J, et al. Long-term functional consequences and ongoing cerebral inflammation after subarachnoid hemorrhage in the rat. *PloS one*. 2014;9(6):e90584.
93. Fahlenkamp AV, Coburn M, de Prada A, Gereitzig N, Beyer C, Haase H, et al. Expression analysis following argon treatment in an in vivo model of transient middle cerebral artery occlusion in rats. *Medical gas research*. 2014;4:11.
94. Shtaya A, Bridges LR, Esiri MM, Lam-Wong J, Nicoll JAR, Boche D, et al. Rapid neuroinflammatory changes in human acute intracerebral hemorrhage. *Annals of clinical and translational neurology*. 2019;6(8):1465-79.
95. Ma Y, Wang J, Wang Y, Yang GY. The biphasic function of microglia in ischemic stroke. *Progress in neurobiology*. 2017;157:247-72.

96. Park IS, Meno JR, Witt CE, Suttle TK, Chowdhary A, Nguyen TS, et al. Subarachnoid hemorrhage model in the rat: modification of the endovascular filament model. *Journal of neuroscience methods*. 2008;172(2):195-200.
97. Prunell GF, Mathiesen T, Diemer NH, Svendgaard NA. Experimental subarachnoid hemorrhage: subarachnoid blood volume, mortality rate, neuronal death, cerebral blood flow, and perfusion pressure in three different rat models. *Neurosurgery*. 2003;52(1):165-75; discussion 75-6.
98. Sehba FA. The rat endovascular perforation model of subarachnoid hemorrhage. *Acta neurochirurgica Supplement*. 2015;120:321-4.
99. Ryang YM, Fahlenkamp AV, Rossaint R, Wesp D, Loetscher PD, Beyer C, et al. Neuroprotective effects of argon in an in vivo model of transient middle cerebral artery occlusion in rats. *Critical care medicine*. 2011;39(6):1448-53.
100. David HN, Haelewyn B, Degoulet M, Colomb DG, Jr., Risso JJ, Abraini JH. Ex vivo and in vivo neuroprotection induced by argon when given after an excitotoxic or ischemic insult. *PloS one*. 2012;7(2):e30934.
101. Ma S, Chu D, Li L, Creed JA, Ryang YM, Sheng H, et al. Argon Inhalation for 24 Hours After Onset of Permanent Focal Cerebral Ischemia in Rats Provides Neuroprotection and Improves Neurologic Outcome. *Critical care medicine*. 2019;47(8):e693-e9.