

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

Einfluss der neutrophilen Granulozyten auf die Blut- Hirn- Schranken- Störung in
einem experimentellen Modell der Subarachnoidalblutung

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

Vorgelegt von

Maximilian Petermeyer
aus Aachen

Mainz, 2025

Wissenschaftlicher Vorstand: Univ.-Prof. Dr. med. Philipp Drees

Tag der Promotion: 03.12.2025

Nachnutzungslizenz: CC-BY-NC-ND-4.0

Inhalt

Abkürzungsverzeichnis	6
Abbildungsverzeichnis	8
1. Einleitung	9
1.1. Zielsetzung der Dissertation	10
2. Literaturdiskussion	11
2.1. Epidemiologische Daten zur SAB und Outcome nach SAB	11
2.2. Ätiologie der spontanen SAB	12
2.3. Klinische Manifestation der SAB und der DCI	13
2.4.1. Computertomographische Diagnostik	14
2.4.2. Digitale Subtraktionsangiographie bei der SAB	15
2.4.3. Liquordiagnostik bei der SAB	16
2.5. Therapie der SAB und DCI	17
2.5.1. Medikamentöse Therapie der DCI	18
2.5.2. Interventionelle Therapie der DCI bei SAB	19
2.6. Pathophysiologie der SAB, EBI und DCI	20
2.6.1. Early brain injury (EBI)	20
2.6.2. Delayed cerebral ischemia (DCI)	22
2.6.3. Zerebraler Vasospasmus	23
2.6.4. Kortikale Streudepolarisation und Streuschämien	24
2.6.5. Störung der kortikalen Mikroperfusion und Bildung von Mikrothromben	25
2.6.6. Weitere sekundär bedingte Komplikationen nach SAB	26
2.6.7. Bedeutung neutrophiler Granulozyten für die Hirnschädigung nach SAB	27
2.7. Fadenperforationsmodell zur experimentellen Induktion einer Subarachnoidalblutung bei der Maus	29
3. Material und Methoden	30
3.1. Aspekte bezüglich des Tierversuchs	30
3.2. Design der experimentellen Studie und Randomisierung	31

3.3. Neutrophilendepletion	32
3.5. Operative Induktion einer SAB im Mausmodell mittels endovaskulärem Fadenperforationsmodell	34
1. OP- Vorbereitung und Anästhesieeinleitung	34
2. Eröffnung der Schädelhaut	36
3. Eröffnung der Schädelkalotte	37
4. Anlage der Hirndrucksonde	38
5. Fixierung der Hirndrucksonde	39
6. Eröffnung des Collums und Präparation der A. carotis im Verlauf	40
7. Anlage der Ligaturen und Clips	41
8. Eröffnung der A. carotis externa zwischen den beiden Ligaturen	42
9. Insertion eine 5,0 Prolenefaden	43
10. Fixierung des 5,0 Prolenefaden	44
11. Entfernung der Clips	45
12. Durchtrennung der A. carotis externa	46
13. Induktion der Subarachnoidalblutung durch den Prolenefaden	47
14. Nahtsetzung und Nachversorgung	48
15. SAB- Induktion und Hirndruck	49
	50
3.6. Histologische Färbungen	51
3.6.1. IgG- Färbung	51
3.6.2. Nissl Färbung	53
3.7. Mikroskopische Analyse und Dokumentation	54
4. Statistik	55
5. Ergebnisse	56
5.1. Mikroskopische Aufarbeitung der Präparate	56
	58
5.2. Charakteristika der randomisierten Gruppen	59

5.3. Ergebnisse der Blutgasanalysen	60
5.4. Störung der Blut-Hirn-Schranke in der Sham Gruppe	61
5.5. Schadensfläche in der SAB- Control- Gruppe	62
5.6. Schadenfläche in der Depletierten- Gruppe	63
5.7. Mittelwerte alle Flächen inklusive Standardabweichung	64
6. Diskussion	65
7. Schlussfolgerung	67
8. Ausblick	68
9. Literaturverzeichnis	69
10. Anhang/ Publikationsverzeichnis	77
10.1. Neutrophils induce a blood brain barrier disruption in a murine model of subarachnoid hemorrhage (Jahreskongress der deutschen Gesellschaft für Neurochirurgie 2021 in Erfurt)	77
10.2 Neutrophils induce a blood brain barrier disruption in a murine model of subarachnoidal hemorrhage (Jahreskongress der European Association of Neurosurgery)	79
10.3. Neutrophils mediate early cerebral cortical hypoperfusion in a murine model of subarachnoid haemorrhage (Nature Scientific report)	81
11. Danksagung	82
12. Lebenslauf	83

Abkürzungsverzeichnis

A.	Arteria
Aa.	Arteriae
ABS	A. basilaris
AcomA	A. communicans anterior
ACA	A. cerebri anterior
ACI	A. carotis interna
ACE	A. carotis externa
ACM	A. cerebri media
ACP	A. cerebri posterior
AcomP	A. communicans posterior
ASCVD	engl.: Extreme Atherosclerotic Cardiovascular Disease Risk Recognition
BGA	Blutgasanalyse
BSH	Bluthirnschrankenstörung
bzw.	beziehungsweise
CBF	Cerebraler Blutfluss
CBV	Cerebrales Blutvolumen
CSF	engl.: Cerebrospinal Fluid (Liquor cerebrospinalis)
CT	Computertomographie
cV	cerebraler Vasospasmus
CSD	engl.: cortical spreading depression (kortikale Streudepolarisationen)
DCI	engl.: delayed cerebral ischemia (verzögerte zerebrale Ischämie)
DSA	Digitale Subtraktionsangiographie
EBI	engl.: early brain injury (frühe Hirnschädigung)
GCS	engl.: Glasgow Coma Scale
IAVT	Intraarterielle Vasodilatationsinfusion Therapie
ICAM- 1	engl.: intracellular adhesion molecule 1
MAP	Mittlerer arterieller Druck
MSCTA	multisektionale CT- Angiographie
MTT	engl.: mean transit time
NO	Stickstoffmonoxid

mm	Milimeter
PCT	Perfusions- CT
PSGL-1	engl.: P- Electin- glycoprotein- ligand- 1
SAHOT	engl.: Subarachnoid haemorrhage outcome tool
TBA	Transluminale Ballon- Angioplastie
FI	Fläche insgesamt in mm ²
FOS	Fläche ohne Schaden in mm ²
SF	Schadenfläche in mm ²
MW Total Vol	Mittelwert Gesamtfläche in mm ²
MW FOS ges	Mittelwert Fläche ohne Schaden gesamt in mm ²
MW SF	Mittelwert Schadenfläche in mm ²
SF%	Schadenfläche in %

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Überblick über das Studiendesign und die Randomisierung	31
Abbildung 2 Eröffnung der Schädelhaut	36
Abbildung 3 Eröffnung der Schädelkalotte mittels einer Fräse	37
Abbildung 4 Anlage der Hirndrucksonde	38
Abbildung 5 Fixierung der Hirndrucksonde.....	39
Abbildung 6 Präparation der Carotisgabel.....	40
Abbildung 7 Anlage von Clips und Ligaturen entlang der A. carotis interna und externa.....	41
Abbildung 8 Eröffnung der A. carotis externa	42
Abbildung 9 Einführen des Prolenefadens.....	43
Abbildung 10 Fixierung des Prolenefadens	44
Abbildung 11 Entfernung der Clips auf der A. carotis interna und A. carotis communis	45
Abbildung 12 Durchtrennung der A. carotis externa	46
Abbildung 13 Induktion der SAB.....	47
Abbildung 14 Schematischer Verlauf des Hirndrucks während der SAB- Induktion im Fadenperforationsmodell	49
Abbildung 15 Exemplarisches Präparat nach IgG Färbung	52
Abbildung 16 Exemplarisches Präparat nach Nissl Färbung	53
Abbildung 17 Nissl und IgG Färbung in der 15 Minuten Gruppe	56
Abbildung 18 Nissl und IgG Färbung in der 3 Stunden Gruppe.....	57
Abbildung 19 Nissl und IgG Färbung in der 3 Stunden Gruppe.....	57
Abbildung 20: Nissl und IgG Färbung in der 24 Stunden Gruppe.....	58
Abbildung 21 Überlebensraten in den Subgruppen	59
Abbildung 22 Anteil des schrankengestörten Areales an der Gesamtfläche in der Shamgruppe	61
Abbildung 23 Anteil des schrankengestörten Areales an der Gesamtfläche in der SAB- Depletierten Gruppe.....	63
Abbildung 24 Mittelwerte aller Schadensflächen in allen Subgruppen mit Standardabweichung.....	64

1. Einleitung

Die spontane Subarachnoidalblutung tritt mit einer Inzidenz von etwa 7.9/100.000 Einwohner (Sacco, Totaro et al. 2009, Etminan, Chang et al. 2019) (Sacco, Totaro et al. 2009, Etminan, Chang et al. 2019) in westlichen Ländern auf und ist dementsprechend häufig im neurochirurgischen und intensivmedizinischen Alltag anzutreffen. Im akuten Intervall überwiegen ein Anstieg des intrakraniellen Drucks, welches einen Abfall des zerebralen Perfusionsdruckes bedingt (Westermaier, Jauss et al. 2009). Die dadurch entstehende transiente, globale zerebrale Ischämie ist neben weiteren, durch die Hämatombildung ausgelösten pathophysiologischen Prozessen verantwortlich für die Ausbildung der frühen Hirnschädigung (engl. EBI: early brain injury). Neben diesen frühen Ereignissen wird das Outcome der Patienten zusätzlich maßgeblich durch die Ausbildung einer verzögerten, zerebralen Ischämie (engl.: DCI: delayed cerebral ischemia) bedingt, welche bei etwa 30% aller betroffenen Patienten beobachtet werden konnte. Wichtige pathophysiologische Komponenten der DCI sind kortikale Streudepolarisationen, Mikrothrombenbildung und zerebrale Vasospasmen (Chaichana, Pradilla et al. 2010, Macdonald 2014, Suarez 2015, Lucke-Wold, Logsdon et al. 2016, Djelilovic-Vranic, Basic-Kes et al. 2017, Muehlschlegel 2018, Neulen, Meyer et al. 2018, Jabbarli, Pierscianek et al. 2019, Neulen, Pantel et al. 2019, Khey, Huard et al. 2020, Scherer, Jung et al. 2020) (Macdonald 2014). Außerdem spielen verschiedene Inflammationsprozesse (Chaichana, Pradilla et al. 2010) eine zentrale Rolle bei der Ausbildung einer EBI, sowie nachfolgend einer DCI (Atangana, Schneider et al. 2017). Es wurde eine Extravasation von neutrophilen Granulozyten bereits früh nach einer SAB beschrieben (Friedrich, Flores et al. 2011, Atangana, Schneider et al. 2017). Später im Verlauf kommt es zur Aktivierung von Mikroglia, (Atangana, Schneider et al. 2017, Gris, Laplante et al. 2019) welche wiederum einen konsekutiven Zelluntergang und zerebrale Gliose bedingen. Experimentelle Daten ergaben einen Zusammenhang zwischen Neutrophilenextravasation und der Aktivierung von Mikroglia. Der Pathomechanismus, welcher über die Neutrophilenextravasation zur Mikrogliaaktivierung führt ist jedoch bislang unklar. Ein möglicher, jedoch bislang nicht belegter Mechanismus wäre eine Beeinflussung der Blut- Hirn- Schranken- Störung welche letztlich die Mikrogliaaktivierung bedingen könnte (Michalak, Lebrun et al. 2012, Üllen, Singewald et al. 2013).

1.1. Zielsetzung der Dissertation

Abgeleitet aus der hohen klinischen und intensivmedizinischen Relevanz, sowie der unzureichenden, grundlegenden Studienlage bezüglich des Zusammenhangs der Extravasation neutrophiler Granulozyten und der Mikrogliaaktivierung ergab sich für die vorliegende Dissertation folgende Fragestellung und Zielsetzung:

Induzieren neutrophile Granulozyten nach experimenteller Subarachnoidalblutung eine Blut- Hirn- Schranken Störung im Mausmodell?

2. Literaturdiskussion

2.1. Epidemiologische Daten zur SAB und Outcome nach SAB

Die Inzidenzwerte bezüglich einer SAB unterliegen einer ausgeprägten geographischen Variabilität und scheinen global bei 7,9/100.000 zu liegen (Etminan, Chang et al. 2019). In Mitteleuropa und Nordamerika (Etminan, Chang et al. 2019) wurden Inzidenzwerte von 7/ 100.000 (Sacco, Totaro et al. 2009) Einwohner berichtet was in etwa 5% aller Schlaganfälle entspricht. Im Median erkrankten Patienten / Patientinnen im Alter zwischen ihrem 45. und dem 55. Lebensjahr, wobei Frauen häufiger erkrankten als Männer, wenn man alle Altersklassen mit einbezieht. Die SAB stellt ein lebensbedrohliches Krankheitsbild dar. So wurde berichtet, dass die Mortalität unter konservativer Therapie in den ersten Monaten bei 50- 60 % liege (Steiner, Juvela et al. 2013). Studien berichten, dass bereits 12 % der SAB- Patienten auf dem Weg ins Krankenhaus bzw. bevor Sie medizinische Aufmerksamkeit erfahren durch das initiale Blutungsereignis versterben (Huang and van Gelder 2002). Andere Studien zeigen, dass nur etwa 30 % aller SAB Patienten in der Lage sind sich körperlich und neurologisch wieder ausreichend zu rehabilitieren, sodass Sie wieder in ihr ursprüngliches soziales und unabhängiges Leben zurückkehren können (Petridis, Kamp et al. 2017). Weitere Studien berichten, dass nur ein geringer Anteil aller betroffenen SAB- Patienten, welche innerhalb des ersten Jahres nicht versterben, eine positive Genesung ohne dauerhafte Einschränkungen aufweisen (Sacco, Totaro et al. 2009, Macdonald 2014).

2.2. Ätiologie der spontanen SAB

Die Ruptur von intrakraniellen Aneurysmen macht etwa 85% aller Ursachen für eine SAB aus. Diese Aneurysmen bilden sich aus den im Subarachnoidalraum verlaufenden, hirnersorgenden Gefäßen des Circulus arteriosus cerebri (Macdonald and Schweizer 2017). Die restlichen 15 % der SABs entfallen einerseits auf unklare Ursachen oder andere zugrunde liegende Ursachen wie z. B. einer arteriovenösen Malformation (Dinc, Won et al. 2019), einer Blutung nach Sinusthrombose (Fu, Rao et al. 2017) oder einer Blutung nach Dissektion intraduraler Gefäße (Bhogal, Brouwer et al. 2015). Bei einem großen Teil der nicht aneurysmatischen SABs gelingt kein Nachweis einer Blutungsursache. Bei Vorliegen von begleitenden kardiovaskulären Risikofaktoren wie Nikotinkonsum oder arterielle Hypertonie steigt das Risiko für eine SAB (Rinkel, Djibuti et al. 1998, van Gijn, Kerr et al. 2007). Darüber hinaus gelten eine kongenitale Wandschwäche der Tunica media, andere familiäre Prädispositionen wie das Marfan Syndrom, das Ehlers- Danlos- Syndrom, eine APCKD oder eine bereits überlebte SAB als anerkannte Risikofaktoren (Rinkel, Djibuti et al. 1998, van Gijn, Kerr et al. 2007). Betrachtet man das räumliche Verteilungsmuster von kranialen Aneurysmen der hirnersorgenden Arterien, so finden sich diese bevorzugt im vorderen Stromgebiet des Circulus arteriosus cerebri bzw. in der A. carotis interna (ACI), der A. cerebri media (ACM) und der A. communicans anterior (Acom). Die hintere Strombahn mit der A. basilaris (ABS) und der A. cerebri posterior (ACP) sind im Vergleich seltener betroffen (van Gijn, Kerr et al. 2007) (Rinkel 2019).

2.3. Klinische Manifestation der SAB und der DCI

Akutes Leitsymptom einer SAB ist der auftretende Vernichtungskopfschmerz, welcher sich holozephal ausbreiten und bis in den Rücken ziehen kann. Je nach Ausmaß kann eine Vigilanzminderung vorliegen. Zudem kann es durch den progredienten intrakraniellen Druckanstieg im Rahmen eines Hydrozephalus zu einer Vigilanzminderung kommen (Muehlschlegel 2018). In Folge der meningealen Reizung bestehen zumeist Kopfschmerzen und ein Meningismus. In einigen Fällen kommt es vor der diagnostizierten SAB bereits zu einer Prodromalblutung, welche sich als ein der SAB vorhergehendes Blutungsereignis mit starken Kopfschmerzen äußert (Bond, Krings et al. 2020). Wichtig ist zu beachten, dass sich die klinische Symptomatik mit unterschiedlicher neurologischer Ausprägung und Intensität manifestieren kann (van Gijn, Kerr et al. 2007).

Die verzögerte zerebrale Ischämie ist klinisch als das akute Auftreten einer globalen oder fokalen neurologischen Verschlechterung definiert. In vielen Fällen lassen sich zerebrale Perfusionsstörungen oder in einigen Fällen Infarkte, sowie in der Mehrzahl der Fälle zerebrale Vasospasmen in der radiologischen Bildgebung detektieren (Francoeur and Mayer 2016, van Lieshout, Dibué-Adjei et al. 2018). Die Diagnostik bezieht darüber hinaus noch weitere Merkmale, wie ein dauerhaftes intensivmedizinisches Monitoring inklusive der wiederholten transkraniellen Dopplersonographie der hirnversorgenden Gefäße mit ein (Toi, Matsumoto et al. 2013). Darüber hinaus kann die transkranielle Dopplersonographie um eine computertomographisch gestützte Perfusionsmessung und eine CT- Angiographie ergänzt werden, um die aktuelle Perfusionsleistung des betroffenen Areals beurteilen zu können (Connolly, Rabinstein et al. 2012, Suarez 2015, Djelilovic-Vranic, Basic-Kes et al. 2017).

Die leitliniengerechte Therapie mit Nimodipin reduziert die Wahrscheinlichkeit für DCI-assoziierte Infarkte und reduziert die Wahrscheinlichkeit für Tod und schlechtes neurologisches Outcome (Hoh et al. 2023). Kommt es dennoch zur DCI, stehen nur eingeschränkte Möglichkeiten zur Verfügung. Insbesondere kommt in den meisten Zentren die Induktion einer Hypertonie zur Anwendung, zudem bei Versagen der konservativen Maßnahmen endovaskuläre Interventionen zur Therapie der Vasospasmen. Diese Methoden sind nicht durch prospektive Studien belegt.

2.4. Diagnostik der SAB und DCI

2.4.1. Computertomographische Diagnostik

Die CT- Diagnostik ist initial die Methode der Wahl, da es breit verfügbar ist und eine rasche erste Bildgebung ermöglicht. In einer Studie wies dabei ein natives CT innerhalb der ersten sechs Stunden eine Sensitivität von 100% für die Detektion von subarachnoidalen Blut auf (Long, Koyfman et al. 2017). Das subarachnoidale Hämatom präsentiert sich dabei hyperdens entlang der Zisternen und der Sulci. Im Anschluss kann eine CT- Angiographie oder ein perfusionsgewichtetes CT anberaumt werden, wobei die CT- Angiographie der Darstellung der Blutungsquelle dient. Eine Studie berichtete zudem, dass mittels des perfusionsgewichteten CTs (CTP) bereits früh nach dem Auftreten der SAB eine prädiktive Einschätzung über das Outcome des Patienten getroffen werden (Kamp, Heiroth et al. 2012).

Auch für die Diagnostik von Vasospasmen und der Beurteilung einer endovaskulären Interventionsmöglichkeit im Kontext einer DCI spielen die CT- Angiographie und die Perfusionsdiagnostik mittlerweile eine zentrale Rolle. Im Vergleich mit der Diagnostik durch die digitale Subtraktionsangiographie (DSA) konnten in einer Meta- Analyse Vasospasmen mit einer Sensitivität von 63- 98 % mittels der CTA nachgewiesen werden (Greenberg, Gold et al. 2010). Die Kombination aus CTP und CTA kann als die beste Möglichkeit angesehen werden um auf der einen Seite Vasospasmen und auf der anderen Seite Störungen in der zerebralen Perfusion nachzuweisen (Zhang, Zhang et al. 2013).

2.4.2. Digitale Subtraktionsangiographie bei der SAB

Für die Lokalisierung und der Konfigurationsdarstellung der Blutungsquelle, zumeist eines intrakraniellen Aneurysmas, ist die digitale Subtraktionsangiographie (DSA) nach wie vor der aktuelle Goldstandard (Bakker, Groen et al. 2014, Catapano, Lang et al. 2020). Zudem kann die DSA die Verdachtsdiagnose eines Vasospasmus belegen (Chaudhary, Ko et al. 2008).

Serielle DSAs in den Wochen nach einer SAB zur Diagnostik von Vasospasmen sind heute unüblich, da mit Dopplersonographie sowie CTA nicht-invasive Techniken verfügbar sind (Chen et al., 2022). Im Falle einer DCI, die nicht auf eine konservative Therapie mit induzierter Hypertonie anspricht, ist es mittels der DSA jedoch möglich, interventionelle Vasospasmusbehandlungen durchzuführen um die Hirnperfusion zu verbessern und Infarkte zu verhindern (Jabbarli et al., 2019). Der positive Einfluss interventioneller Vasospasmustherapien auf das neurologische Outcome ist bislang allerdings nicht durch prospektive Studien belegt.

2.4.3. Liquordiagnostik bei der SAB

In der Regel wird dieses Verfahren nur bei CT- negativen Subarachnoidalblutungen angewendet, sofern auf Grund der Anamnese dennoch der klinische V. a. eine SAB besteht. Die Diagnostische Beurteilung des CSF setzt sich dabei aus der optischen Beurteilung, sowie der Liquorzytologie zusammen. Bezüglich der optischen Beurteilung spricht ein blutiger bzw. xanthochrom verfärbter CSF für das Vorliegen einer SAB. Diese optische Beurteilung kann gegebenenfalls durch den spektrophotometrischen Nachweis einer visuell nicht nachweisbaren Xanthochromie unterstützt werden. Eine Xanthochromie kann mittels einer Zentrifugation nachgewiesen werden und spielt bei der Abgrenzung von einer iatrogen herbeigeführten Blutungsquelle eine wichtige Rolle. Die Diagnostik der Liquorzytologie beruht vor allem auf dem Nachweis von Erythrophagen und Siderophagen sowie der Beurteilung des Ferritin und Albuminspiegels im CSF, wobei dieser im Vergleich mit dem Serum beurteilt wird (Tumani, Petzold et al. 2010). Wichtig für eine akkurate Diagnostik des Liquorpunktes ist die Zusammenschau aller hier aufgeführter Parameter, vor dem Hintergrund der Veränderung der CSF- Zusammensetzung im zeitlichen Verlauf nach einer SAB.

2.5. Therapie der SAB und DCI

Die möglichen Therapiemaßnahmen nach einer SAB umfassen stets einen multimodalen Ansatz und sollten sich mit der intensivmedizinischen Überwachung, der möglichen Versorgung eines ruptierten Aneurysmas und dem Management der vielseitigen, sekundären Komplikationen einer SAB beschäftigen (Connolly, Rabinstein et al. 2012, Steiner, Juvela et al. 2013, Thompson, Brown et al. 2015). Empfohlen wird generell eine hämodynamische Stabilisierung des Patienten, welche intensivmedizinisch überwacht werden sollte und eine Normotonie, Normovolämie, Normothermie und Normoglykämie beinhalten (Steiner, Juvela et al. 2013). Die European Stroke Association empfiehlt eine Blutdrucksenkung nur bei systolischen arteriellen Druckwerten über 180mmHg, um das Risiko einer weiteren Aneurysmaruptur zu minimieren (Steiner, Juvela et al. 2013). Die früher etablierte Triple- H- Therapie bestehend aus Hypertension, Hypervolämie und Hämodilution findet in den aktuellen Leitlinien keine Empfehlung mehr (Thompson, Brown et al. 2015). Bereits die Gabe des Calciumantagonisten Nimodipin zur Vasospasmusprophylaxe und eine bedarfsgerechte Analgesie tragen zur Kontrolle des Blutdrucks bei (Sandow, Diesing et al. 2016). Das Management möglicher Komplikationen nach einer SAB umfasst die Therapie von epileptischen Anfällen mittels einer antikonvulsiven Therapie (Harroud and Crepeau 2017), die Anlage eines ventrikuloperitonealen Shunts zur Therapie eines Hydrozephalus (Di Russo, Di Carlo et al. 2020) und die Prophylaxe und Therapie von Vasospasmen und einer DCI (Macdonald, Hänggi et al. 2019).

2.5.1. Medikamentöse Therapie der DCI

Die aktuell einzige etablierte Medikamentenklasse zur Behandlung und Prophylaxe von Vasospasmen nach SAB ist der Kalziumkanal- Antagonist Nimodipin (Budohoski, Guilfoyle et al. 2014, Albanna, Weiss et al. 2017). In mehreren Studien konnte nachgewiesen werden, dass das Risiko, ein schlechtes Outcome nach einer SAB zu erleiden durch die Einnahme des Dihydropyridin- Derivates Nimodipin signifikant reduziert werden konnte (Lei et al. 2023; Hao, 2022). Die Einnahme von Nimodipin wird dabei für einen Zeitraum von 14-21 Tagen nach einer stattgehabten SAB empfohlen (Connolly, Rabinstein et al. 2012, Steiner, Juvela et al. 2013). In einer Doppelblindstudie reduzierte die Einnahme von 60mg Nimodipin alle vier Stunden das Risiko eines zerebralen Infarktes nach einer SAB im Vergleich zur Placebo- Gruppe signifikant um 34% (Pickard, Murray et al. 1989). Darüber hinaus reduzierte Nimodipin das Risiko für ein schlechtes neurologisches Outcome in dieser Studie um 40% (Pickard, Murray et al. 1989). Die aktuelle Applikationsempfehlung von Nimodipin sieht die orale Gabe in einem vier Stunden Rhythmus vor, wobei auch eine intravenöse Gabe möglich ist, wenn die orale Applikation kontraindiziert oder nicht möglich ist (Connolly, Rabinstein et al. 2012, Steiner, Juvela et al. 2013). Zu beachten ist das Nebenwirkungsspektrum, dass von arterieller Hypotension bis zu hepatischen und gastrointestinalen Nebenwirkungen reichen kann (Viderman, Sarria-Santamera et al. 2021). Andere pharmakologische Ansätze wie die Therapie mit dem Endothelinrezeptorantagonisten Clazosentan, ventrikulärer Applikation von Nimodipin, Statinen, Magnesiumsulfat haben sich in prospektiven Studien der Therapie mit Nimodipin nicht überlegen gezeigt (Macdonald, 2012; Al-Salihi, 2024). Diskutiert wird derzeit eine Plättchenhemmung früh nach SAB, was über einen Effekt auf Mikrothrombosen die Hirnperfusion verbessern und somit neuroprotektiv wirken soll. Eine erste prospektive Studie mit Tirofiban hat diesbezüglich vielversprechende Ergebnisse geliefert, wobei allerdings nur eine kleine Kohorte an einem Zentrum untersucht wurde (Zanaty et al., 2021). Es bleibt abzuwarten, ob zukünftige größere klinische Studien einen positiven Effekt einer Plättchenhemmung untermauern.

2.5.2. Interventionelle Therapie der DCI bei SAB

Die Entscheidung, ein interventionelles Therapiekonzept in Erwägung zu ziehen, greift in der Regel erst bei Versagen der konservativen Therapie (Connolly, Rabinstein et al. 2012, Steiner, Juvela et al. 2013) im Sinne eines individuellen Heilversuchs. Die beiden Hauptsäulen der interventionellen Therapie bestehen dabei aus einer transluminalen Ballonangioplastie (TBA) bzw. einer kathetergestützten Ballondilatation und der intraarteriellen Vasodilatationsinfusion- Therapie (IAVT) (Abruzzo, Moran et al. 2012), die auch kontinuierlich über intraarterielle Mikrokatheter möglich ist (Kramer et al., 2022). In einer kürzlich publizierten Studie wurde der Effekt der interventionellen Vasospasmustherapie bei therapierefraktärer DCI untersucht, wobei Angioplastien verwendet wurde (Vatter et al., 2022). Die Studie wurde nach einer Zwischenauswertung beendet, da die endovaskulär behandelten Patienten ein schlechteres Outcome zeigten als die konservativ behandelten Patienten. Die intraarterielle Applikation von Vasodilatoren scheint ein günstigeres Outcome zu bewirken, der Nachweis des Effekts der i. a. Applikation von Nimodipin oder anderen Pharmaka durch prospektive Studien steht jedoch aus.

2.6. Pathophysiologie der SAB, EBI und DCI

Wie bei anderen neurologischen Erkrankungen bietet sich auch bei der SAB die Einteilung in eine primäre und eine sekundäre Hirnschädigung an. Im Rahmen einer SAB kommt es als direkte Folge der Blutung zu einer primären Hirnschädigung, im weiteren Verlauf über verschiedene Pathomechanismen zur sekundären Hirnschädigung. Klinische Studien unterteilen zumeist im Hinblick auf den zeitlichen Verlauf in eine EBI und eine DCI (Macdonald 2014, Macdonald and Schweizer 2017). Unter einer EBI wird dabei zumeist die Hirnschädigung definiert, die als direkte Folge der SAB und der transienten, globalen zerebralen Ischämie innerhalb von 72h nach SAB auftritt (Macdonald 2014, van Lieshout, Dibué-Adjei et al. 2018). Unter DCI werden die Schäden zusammengefasst, die innerhalb von 4- 21 Tagen nach SAB auftreten, sofern sich keine andere zugrunde liegende Ursache finden lässt (Budohoski, Guilfoyle et al. 2014, Macdonald 2014). Das Outcome nach SAB beruht maßgeblich auf dem Ausmaß von EBI und DCI. Im weiteren Verlauf wird gesondert auf beide Pathophysiologien eingegangen.

2.6.1. Early brain injury (EBI)

Als EBI werden alle pathophysiologischen Prozesse zusammengefasst, welche innerhalb der ersten 72h nach dem SAB- Ereignis eintreten, wobei es sich um einen multifaktoriellen Prozess handelt, welcher in seiner Komplexität immer noch im Fokus der aktuellen Forschung steht. Ruptiert ein intrakranielles Aneurysma, entsteht eine Blutung in den Subarachnoidalraum hinein (Petridis, Kamp et al. 2017). Durch dieses Blutungsereignis kommt es initial zu einem Volumenausstrom aus dem ruptierten Gefäß, welches den erheblichen Anstieg des intrakraniellen Druckes (ICP) nach sich zieht. Der zerebrale Perfusionsdruck (CPP) hingegen fällt konsekutiv ab und führt zu einer transienten globalen Ischämie (Westermaier, Jauss et al. 2009). Durch den Anstieg des ICP kann es zu einer weiteren direkten Schädigungen des Hirnparenchyms kommen, welche durch Einblutungen in das Hirngewebe oder durch einen Durchbruch der Blutungsanteile in das Liquorsystem begleitet werden können (Wijdicks, Vandongen et al. 1988). Der Abfall des CPP bedingt eine Perfusionsstörung, welche sich nicht nur auf das Areal um die SAB beschränkt, sondern sich als transiente globale zerebrale Ischämie auf das gesamte Hirn auswirkt (Macdonald 2014, Macdonald and Schweizer 2017). Nach Sistieren der Blutung pendeln sich der ICP und der MABP wieder auch hochnormale- und der CPP wieder auf niedernormale

Werte ein, wodurch die zerebrale Perfusion sich wieder den Normwerten angleicht. Studien konnten zeigen, dass das subarachnoidale Hämatom bereits kurz nach seinem Auftreten verschiedenen Degradationsprozessen unterliegt, welche in ihrer Gesamtheit verschiedene toxische Prozesse anstoßen, zudem kommt es rasch zur Extravasation von Leukozyten, was zusammen mit dem Perfusionsdefizit und der direkten Hirnparenchymschädigung als weitere Faktoren für die EBI zusammengefasst werden können (van Lieshout et al., 2018 ; Macdonald et al., 2014).

2.6.2. Delayed cerebral ischemia (DCI)

Die DCI entsteht auf dem Boden einer multifaktoriell bedingten Pathophysiologie und wird als eine der wichtigsten Faktoren für das neurologische Outcome angesehen (Macdonald 2014, Macdonald and Schweizer 2017). Zeitlich lässt sich die DCI in der Regel 72h bis 21 Tage nach der SAB beobachten. Globale oder fokale neurologische Verschlechterungen ohne anderweitig erklärbare Ursache werden von den meisten Autoren als DCI definiert (Vergouwen, Vermeulen et al. 2010). Die pathophysiologischen Prozesse umfassen unter anderem die Ausbildung von Mikrothromben, mit der DCI assoziierte kortikale Streudepolarisationen sowie Vasospasmen der großen und kleinen kortikalen Gefäße (Macdonald et al., 2014). Darüber hinaus kommt es bereits mit Eintreten der EBI zu toxischen Degradationsprozessen des Hämatoms (de Oliveira Manoel and Macdonald 2018, van Lieshout, Dibué-Adjei et al. 2018) sowie der Extravasation von Leukozyten. Die dadurch getriggerten inflammatorischen Prozesse tragen ebenfalls zur EBI und DCI bei. Prädiktor für viele ältere Studien war der zerebrale Vasospasmus (cV), welcher zu einem zweiten Perfusionsdefizit führen und dementsprechend einen weiteren Infarkt bedingen kann. Neuere Forschungsdaten relativieren aktuell jedoch den alleinigen Fokus auf die cV als Prädiktor für die Entwicklung einer DCI und der mit der DCI einhergehenden Komplikationen (Schubert, Seiz et al. 2009, Schubert, Seiz et al. 2011, Honda, Sase et al. 2012, van Lieshout, Dibué-Adjei et al. 2018). Insbesondere der Fakt, dass nur etwa 30 – 40% aller Patienten, bei denen ein zerebraler Vasospasmus auftritt auch klinische Symptome einer DCI aufweisen untermauert die Argumentation, den Fokus nicht alleine auf den cV zu richten (Dorsch 2011, Foreman 2016). Vielmehr etabliert sich aktuell ein multimodaler Ansatz, welcher eine Vielzahl pathophysiologische Ansätze mit einbezieht.

2.6.3. Zerebraler Vasospasmus

Für den klinischen Verlauf eines SAB-Patienten spielt der Vasospasmus, der mit einer zerebralen Hypoperfusion bzw. dem Auftreten eines Infarktes kann assoziiert sein kann, eine wichtige Rolle, da interventionelle Verfahren zur Vasospasmustherapie zur Verfügung stehen (Vergouwen, Vermeulen et al. 2010, Dorsch 2011, Gross, Lin et al. 2012, Neulen, Meyer et al. 2018). Definieren lässt sich der zerebrale Vasospasmus als die Kombination von angiographisch bzw. radiologisch nachweisbaren Alternationen im Gefäßdurchmesser. Mit dem klinischen Bild einer DCI oder einer zerebralen Hypoperfusion ist er jedoch nur bei etwa 30 % aller SAB-Patienten assoziiert (Vergouwen, Vermeulen et al. 2010). Die Wahrscheinlichkeit des Auftretens eines zerebralen Vasospasmus geht mit der Menge an subarachnoidalen Blut einher sowie diversen toxischen Abbauprodukten aus dem subarachnoidalen Hämatom, welche arterielle Spasmen induzieren können (van Lieshout, Dibué-Adjei et al. 2018). Bereits mit Einsetzen der subarachnoidalen Blutung kommt es zur Degradation von Hämatombestandteilen. Insbesondere der Abbau von Häm- haltigem Hämoglobin aus den Erythrozyten scheint mitverantwortlich zu sein für die Freisetzung von diversen Sauerstoffradikalen, welche wiederum die Synthese und Freisetzung verschiedener vasokonstriktorischer Substanzen anstoßen (Macdonald and Weir 1991). Zudem zeigen experimentelle Arbeiten, dass die Extravasation von neutrophilen Granulozyten in das perivaskuläre subarachnoidale Hämatom eine wichtige Rolle spielt (Provencio, 2013) . Dieser Mechanismus führt in seiner Gesamtheit zu einem erhöhten oxidativen Stress und einer ausgeprägten Inflammationsreaktion, was letztlich zur vermehrten Vasokonstriktion führt (Macdonald 2014).

2.6.4. Kortikale Streudepolarisation und Streuschämien

Kortikale Streudepolarisationen lassen sich als eine Welle von Depolarisationswellen der Gliazellen und Neuronen beschreiben, welche mit dem Nettoinflux von Kationen und Wasser einhergehen. Diese Depolarisationswellen bedingen eine Tonusänderung in den kortikalen Widerstandsgefäßen, welche über die inverse neurovaskuläre Kopplung zu einer Streuschämie führen (Dreier, Drenckhahn et al. 2013). Diese inverse neurovaskuläre Kopplung lässt sich als eine abnorme Reaktion des Mikrozirkulationsapparates des „tissue at risk“ auf die kortikalen Streudepolarisationen definieren (Strong and Macdonald 2012). In Tierversuchen korreliert das Auftreten von Streudepolarisationen direkt mit einer ausgeprägten kortikalen Nekrose, wohingegen beim Menschen eine zeitliche Korrelation zwischen den kortikalen Streudepolarisationen und ischämischen Läsionen hergestellt werden konnte (Dreier, Drenckhahn et al. 2013). Verfahren, die auf kortikale Streudepolarisation und Streuschämien zur Neuroprotektion nach SAB abzielen, sind in klinischen Studien jedoch bislang nicht belegt.

2.6.5. Störung der kortikalen Mikroperfusion und Bildung von Mikrothromben

Die Ausbildung von Mikrothromben ist also ein multifaktoriell getriggert Prozess. Unterschiedliche Arbeiten haben verschiedene pathophysiologische Phänomene aufgezeigt, die zur Ausbildung von Mikrothromben führen können. Getriggert durch oxidativen Stress und die angestoßenen Inflammationsprozesse kommt es zur Schädigung der Basallamina des Endothels (Macdonald 2014). Dadurch und durch die gestörte Hämostase kommt es zur Extravasation von Thrombozyten, sowie zu deren intravasaler Aktivierung. (Vergouwen, Vermeulen et al. 2008). Ein weiterer Ansatz beschäftigt sich mit der gestörten Autoregulation der kleineren Arterien und Arteriolen. Durch eine inverse neurovaskuläre Kopplung kommt es zu einer zusätzlichen Vasokonstriktion was letzten Endes in einer herabgesetzten mikrovaskulären Perfusion resultiert und die Plättchenaggregation begünstigt (Strong and Macdonald 2012). Darüber hinaus spielt auch die gestörte bzw. herabgesetzte Synthese des Vasodilatators NO (Budohoski, Guilfoyle et al. 2014) eine wichtige Rolle. Eine aktuelle klinische Studie an einem kleinen Patientenkollektiv legt nahe, dass das Outcome nach SAB verbessert sowie die Inzidenz der DCI reduziert werden kann durch eine frühe Plättchenhemmung mit Tirofiban, was auf die Mikrothromben abzielt (Zanaty, 2021). Es bleibt abzuwarten, ob dies in größeren klinischen Studien belegt werden kann.

2.6.6. Weitere sekundär bedingte Komplikationen nach SAB

Nach einer SAB kann es zur Entwicklung eines Hydrozephalus kommen, welcher durch eine Zirkulationsstörung des Liquor cerebrospinalis (CSF) bedingt wird (van Gijn, Kerr et al. 2007). Lässt sich die zugrunde liegende Störung auf der Ebene der Pacchioni- Granulationen (Granulationes arachnoidea) finden, so spricht man von einem Hydrozephalus malabsorptivus. Bricht die Blutung in das Ventrikelsystem ein, so können sich Blutkoagel bilden, welche wiederum die Liquorzirkulation innerhalb der Ventrikel beeinträchtigen. Fußt der pathophysiologische Hintergrund darauf, so spricht man von einem Hydrozephalus occlusus (Chen, Luo et al. 2017, Di Russo, Di Carlo et al. 2020). Die Behandlung eines Hydrozephalus begründet sich in der Regel auf der Drucksenkung im Liquorraum, welche entweder über die lumbale oder ventrikuläre Punktion des Liquorraumes oder durch die Anlage eines Liquorshunts gelingen kann, (Paisan, Ding et al. 2018). Im Verlauf kann es nach einer SAB zu epileptischen Anfällen (Harroud and Crepeau 2017), zu kardialen Komplikationen wie einer neurogenen Kardiomyopathie (Boes, Henning et al. 2011, Li, Yuan et al. 2020) oder einem neurogenem Lungenödem (Kitamura, Nomura et al. 2010) kommen. Darüber hinaus sind weitere Komplikationen mit Entwicklung eines systemischen, inflammatorischen Response- Syndroms beschrieben worden (Zhong, Zhang et al. 2017).

2.6.7. Bedeutung neutrophiler Granulozyten für die Hirnschädigung nach SAB

Nicht nur bezüglich der SAB sondern auch vor dem Hintergrund anderer Erkrankungen wie dem Schädel Hirn Trauma wird die Rolle der Neuroinflammation und der neutrophilen Granulozyten als pathophysiologischer Trigger diskutiert (Chaichana, Pradilla et al. 2010, Atangana, Schneider et al. 2017).

In experimentellen Studien konnte durch Hemmung der Leukozyten- Endothel-Interaktion und somit der Extravasation eine Rolle von Neutrophilen bei der Entwicklung von Vasospasmen und der Aktivierung von Mikroglia gezeigt werden. Dargestellt werden konnte dies bereits in einer Studie, bei welcher das Extravasationsverhalten von Leukozyten nach der Blockade des intracellulär-adhäsionsmolekuls 1 (ICAM-1), sowie den Cluster of Differentiation- 11 (CD11) und CD18 (Bavbek, Polin et al. 1998) untersucht wurde. Hierdurch konnte ein verringertes Auftreten von Vasospasmen erreicht werden. Provencio et al. (Provencio, Altay et al. 2011) verfolgten diesen Ansatz weiter und postulierten eine zentrale Beteiligung von neutrophilen Granulozyten an diesem Inflammationsereignis und der Ausbildung von Vasospasmen und einer DCI. In ihren Studien konnten Provencio et al. (Provencio, Altay et al. 2011) zeigen, dass durch die Induktion einer Neutropenie durch die Injektion eines anti- Ly6G Antikörpers das Auftreten von Vasospasmen und das neurologische Outcome nach SAB in einem experimentellen SAB-Modell verbessert werden konnte (Provencio, Fu et al. 2010). Zudem konnte eine Korrelation zwischen der erhöhten Neutrophilenkonzentration in Liquorproben und der Auftrittswahrscheinlichkeit von Vasospasmen nachgewiesen werden. (Provencio, Fu et al. 2010). In den gleichen Liquorproben ließen sich erhöhte Marker für oxidativen Stress ermitteln. Aus anderen Studien ist darüber hinaus bekannt, dass neutrophile Granulozyten innerhalb von wenigen Minuten im Bereich einer Infektion akkumulieren (Kolaczowska and Kubes 2013, Kruger, Saffarzadeh et al. 2015). Friedrich et al. gingen in einem Rattenmodell einen Schritt weiter und konnten nachweisen, dass die neutrophilen Granulozyten nicht nur in direkter Umgebung einer Infektion oder Verletzung an zu treffen sind, sondern auch innerhalb kürzester Zeit in den kleinen zerebralen Gefäßen und im Hämatom akkumulieren (Friedrich, Flores et al. 2011). Auch bei Mäusen konnte mittels in vivo Mikroskopie eine Leukozyten- Adhäsion an postkapilläre Venolen innerhalb von 10 Minuten nach einer SAB- Induktion beobachtet werden (Yang, Chen et al. 2018).

Wie bereits beschrieben stieg nach einer SAB die Genexpression für das intracellulär-adhäsionsmolekül-1 (ICAM-1) an. Neben dem ICAM-1 steigt auch die Expressionsrate des P-Selectin-Glykoprotein-Ligand-1 (PSGL-1), wobei beide verantwortlich für die Neutrophil-Endothel-Interaktion sind. Die Genexpression weiterer Inflammationsmarker, wie IL-6, proinflammatorische Monozyten sowie auch die Rate an Caspase-3-positiven apoptotischen Neuronen war im Vergleich zu Kontrollgruppen signifikant erhöht (Gris, Laplante et al. 2019).

In einer Studie mit ICAM-1- und PSGL-1-knock-out-Mäusen konnte ein verringertes Extravasationsverhalten der neutrophilen Granulozyten nach experimenteller SAB gezeigt werden und eine damit assoziierte, signifikant verringerte Aktivierung von Mikroglia im längerfristigen Verlauf festgestellt werden (Chaichana, Pradilla et al. 2010, Atangana, Schneider et al. 2017, Gris, Laplante et al. 2019). Somit implizieren diese Daten, dass die Neutrophilene extravasation zeitverzögert zu einer Mikrogliaaktivierung beiträgt, wobei keine Invasion der Neutrophilen ins Hirnparenchym stattfindet. Die Neutrophil-Endothel-Aktivierung als erste inflammatorische Reaktion ist dabei direkt nach dem SAB-Ereignis zu beobachten und erreicht ihr Maximum am vierten Tag post-SAB. Erst zeitverzögert kommt es zur Mikrogliaaktivierung, wobei die pathophysiologischen Mechanismen der Interaktion zwischen Neutrophilen und Mikroglia unklar sind. Diese Aktivierung der Mikroglia bedingt einen konsekutiven neuronalen Zelltod.

2.7. Fadenperforationsmodell zur experimentellen Induktion einer Subarachnoidalblutung bei der Maus

Im Verlauf der letzten Jahre haben sich im Wesentlichen zwei verschiedene Modelle zur experimentellen Induktion einer SAB bei der Maus etabliert. Zum einen das Fadenperforationsmodell, bei welchem ein Prolenefaden über die A. carotis bis nach intrazerebral vorgeschoben wird und durch die Perforation der Gefäßwand des Circulus arteriosus cerebri (Bühler, 2014) eine SAB induziert wird. Dem gegenüber steht das Injektionsmodell, bei welchem autologes Blut in die Cisterna magna injiziert wird (Kamp, 2014). Das Injektionsmodell eignet sich für die Untersuchung von lokalen Vasospasmen und Degradationsprozessen, jedoch ähnelt das Fadenperforationsmodell eher der Pathophysiologie beim Menschen. Hierbei lässt sich eine feinere, homologe Verteilung von Blutungsanteilen im Subarachnoidalraum beobachten (Bühler, 2014) Durch ein standardisiertes Vorgehen konnte die Mortalität im Verlauf der letzten Jahre deutlich gesenkt werden (Schüller, 2013).

3. Material und Methoden

3.1. Aspekte bezüglich des Tierversuchs

Die tierexperimentellen Arbeiten wurden von der zuständigen Behörde (Landesuntersuchungsamt Rheinland-Pfalz) genehmigt und unter der Einhaltung des Tierschutzgesetzes durchgeführt. Darüber hinaus wurden alle internationalen und nationalen Richtlinien bezüglich der Haltung und Verwendung von Tieren erfüllt.

Alle verwendeten Tiere waren männliche C57BL/6N Mäuse (Janvier, Saint-Berthevin Cedex, Frankreich) und befanden sich im Alter von 11-12 Wochen. Gehalten wurden alle Tiere entsprechend den jeweiligen Richtlinien bei einem Licht-Dunkel-Wechsel von jeweils 12 Stunden, einer Temperatur von 23 ± 1 °C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von $55\% \pm 5\%$. Ein Zugang zu Wasser und Nahrung (von Altromin, Lage, Deutschland) wurde durchgehend gewährleistet. Um eine vergleichbare Determinante bezüglich des Wohlbefindens der Versuchstiere zu determinieren, wurde täglich das Körpergewicht gemessen und protokolliert. Alle Tiere, Daten und Proben wurden verblindet und mit Nummer versehen, welche einen Rückschluss auf die jeweilige Gruppenzugehörigkeit nicht zulassen.

3.2. Design der experimentellen Studie und Randomisierung

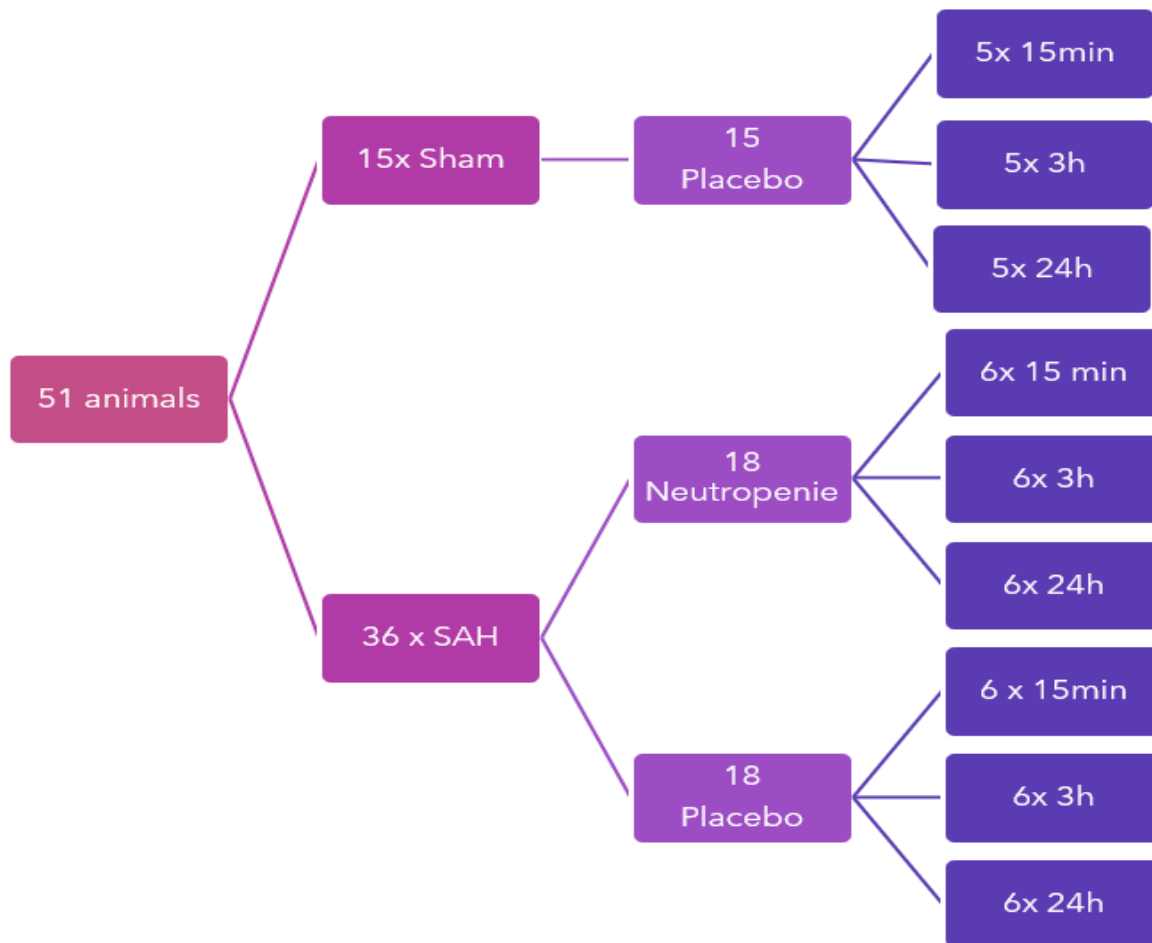


Abbildung 1 Überblick über das Studiendesign und die Randomisierung

Die insgesamt 51 Versuchstiere wurden in eine 36 Tiere umfassende SAB- Gruppe und eine 15 Tiere umfassende Sham- Gruppe aufgeteilt. Die 15 Sham- Tiere erhielten ein Placebo. Innerhalb der SAB-Gruppe erfolgte eine weitere Randomisierung: In einer Untergruppe wurde eine Neutropenie induziert, die andere erhielt ein Placebo. Die Organentnahme erfolgte nach 15min, 3h und 24h post- SAB-Induktion.

Die Randomisierung in der SAB-Gruppe entsprach dem Vorgehen in einer Vorstudie (Neulen et al, 2019). Um die Anzahl der Versuchstiere gering zu halten, wurden gemäß der Triple- R- Strategie die Präparate (SAH) aus der Vorstudie („biochemistry group“, (Neulen et al, 2019)) aufgearbeitet, die den SAB-Gruppen entsprechen und auf eine Wiederholung des Versuchs in diesen Gruppen verzichtet. Die Shamgruppe wurde ergänzt.

3.3. Neutrophilendepletion

Für die Depletion der neutrophilen Granulozyten wurde den Versuchstieren in den Neutropenie- Gruppen 12 Stunden vor der SAB- Induktion ein gegen das Ly6G- Antigen gerichteter Antikörper intraperitoneal injiziert. Das Ly6G- Antigen wird von neutrophilen Granulozyten aber auch von sich entwickelnden Monozyten exprimiert und ist ein guter Marker um in der Forschung zwischen verschiedenen myeloiden Zellen zu unterscheiden (Greter, Lelios et al. 2015). Die intraperitoneale Injektion von anti- Ly6G- Antikörpern ist eine mittlerweile etablierte Methode, um bei der Maus eine Neutropenie zu induzieren (Provencio, Altay et al. 2011). Von dem hier verwendete Antikörper (in vivo Plus anti- mouse Ly6G; Bio X Cell, West Lebanon, New Hampshire, USA) wurden in der Neutropenie- Gruppe 130µl intraperitoneal injiziert, wohingegen den Kontrollgruppen 130µl Kochsalzlösung als Placebo injiziert wurden. Alle Tiere der Shamgruppe erhielten ebenfalls 130 µl Kochsalzlösung i.p. als Placebo. Beide Injektionen erfolgten 12 Stunden vor der SAB- Induktion.

3.4. Transkardiale Perfusion und Aufarbeitung der Proben im Kryostat

Am Ende der operativen Induktion der SAB erfolgte die Aufarbeitung der Tiere je nach Zuordnung in die einzelnen Subgruppen entweder direkt im Anschluss oder nach 15min, 3h oder 24h. Die Tiere wurden in tiefer Narkose nach Blutentnahme mit eiskalter DPBS (Sigma- Aldrich, Hamburg, Deutschland mit $MgCl_2$ und $CaCl_2$ bei einem pH von 7,4) transkardial perfundiert und dekapitiert (Neulen, Pantel et al. 2019). Vor der transkardialen Perfusion erfolgte die Punktion der linken A. femoralis um Blutproben für eine Blutgasanalyse (BGA) zu entnehmen. Die bei jedem Tier durchgeführte BGA wurde mittels des Punktats aus der linken A. femoralis und eines Gerätes zur Blutgasanalyse (ABL 800 basic, Radiometer GmbH, Krefeld, Germany) durchgeführt.

Anschließend wurde das Hirnpräparat schnellstmöglich entfernt und in gekühltes DPBS transferiert. Um eine zwischenzeitliche Haltbarkeit zu erreichen, wurden die Proben in Trockeneis schockgefroren und bis zur histologischen Aufarbeitung bei $-80^{\circ}C$ gelagert. Zur kryostatischen Aufarbeitung wurden die Proben aus dem Kühlfach entnommen und occipital mittels einem Fixierungsgel (Tissue Tek) auf einer Unterlegscheibe fixiert. Mit Hilfe eines Kryostaten (HM 560 Cryo-Star, Thermo Fisher Scientific, Walldorf, Deutschland) wurden $12\ \mu m$ dicke coronare Schnitte in $500\ \mu m$ Intervallen angefertigt wie bereits von (Wu, Cai et al. 2021) beschrieben. Jeweils 8-10 Schnitte wurden auf Superfrost Plus Objektträgern fixiert (Thermo Fisher, Waltham, MA, USA). Die erste Schnittebene wurde nach Maßgaben des Mouse Brain Library Atlas (www.mbl.org) bei Bregma $+3,14$ gesetzt. Für jede Schnittebene wurden insgesamt $10 \times 12\ \mu m$ dicke Schnitte zur histologischen Aufarbeitung sowie $4 \times 25\ \mu m$ für biochemische Analysen entnommen. Je nach anatomischer Struktur des jeweiligen Präparates konnten 10- 15 Schnittebenen pro Tier in unserer Aufarbeitung mit aufgenommen werden.

3.5. Operative Induktion einer SAB im Mausmodell mittels endovaskulärem Fadenperforationsmodell

1. OP- Vorbereitung und Anästhesieeinleitung

Die Operation erfolgt in Narkose mit Isofluran, zur Schmerztherapie erfolgt bereits vor der Narkoseeinleitung die subkutane Gabe von Buprenorphin (Indivior, Slough, Berkshire, UK; 0,1mg/kg Körpergewicht). Die Narkoseeinleitung erfolgt mit 40% Sauerstoff sowie 4% Isofluran für eine Minute.

Zur Aufrechterhaltung der Anästhesie wird das Versuchstier mit dem Kopf in einer Narkosevorrichtung platziert und unter Spontanatmung durchgehend mit 2%-iger Isofluranexposition in der Narkose gehalten. Zu beachten ist, dass die gesamte Operation auf einem Wärmefeld (Physitemp Instruments LLC, Clifton, NJ, USA) erfolgt, welches die Körperkerntemperatur auf 36- 37° C konstant halten soll. Zum Monitoring der Temperatur wird dafür ein Thermometer rektal eingeführt. Zur Sicherung der ausreichende Narkosetiefe wird eine Schmerzreaktionsprüfung durchgeführt, bei welcher der Zehenreflex überprüft wird. Nur bei Ausbleiben des Zehenreflexes ist die Narkosetiefe ausreichend, um fortzufahren. Die Schmerztherapie mit Buprenorphin wird nach OP-Ende fortgesetzt.

2. Eröffnung der Schädelhaut

Das Versuchstier wird in der Bauchlagerung auf dem Wärmefeld gelagert. Nach der Sicherstellung der ausreichenden Narkosetiefe wird die Schädelhaut entlang der Sagittallinie eröffnet. Im Anschluss wird die Linea temporalis dargestellt.

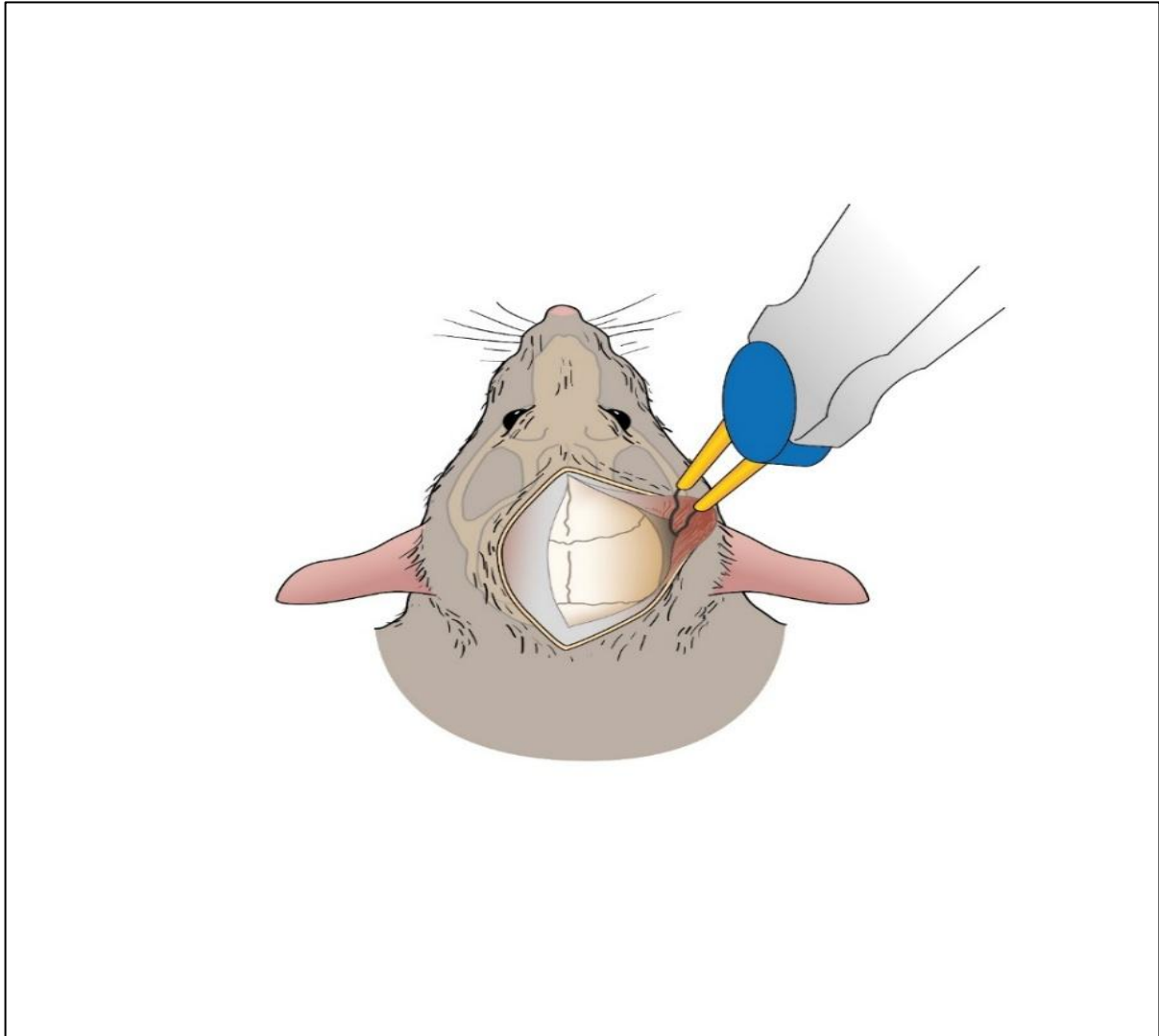


Abbildung 2 Eröffnung der Schädelhaut

Die Eröffnung der Schädelhaut erfolgt entlang der Sagittallinie und bietet anschließend freie Sicht auf die Kalotte.

3. Eröffnung der Schädelkalotte

Das Versuchstier wird nach wie vor in Bauchlagerung gelagert. Mittels einer kleinen Fräse wird ein Bohrloch angebracht, welches einen ausreichenden Durchmesser für die anschließende Einbringung einer Drucksonde aufweist.

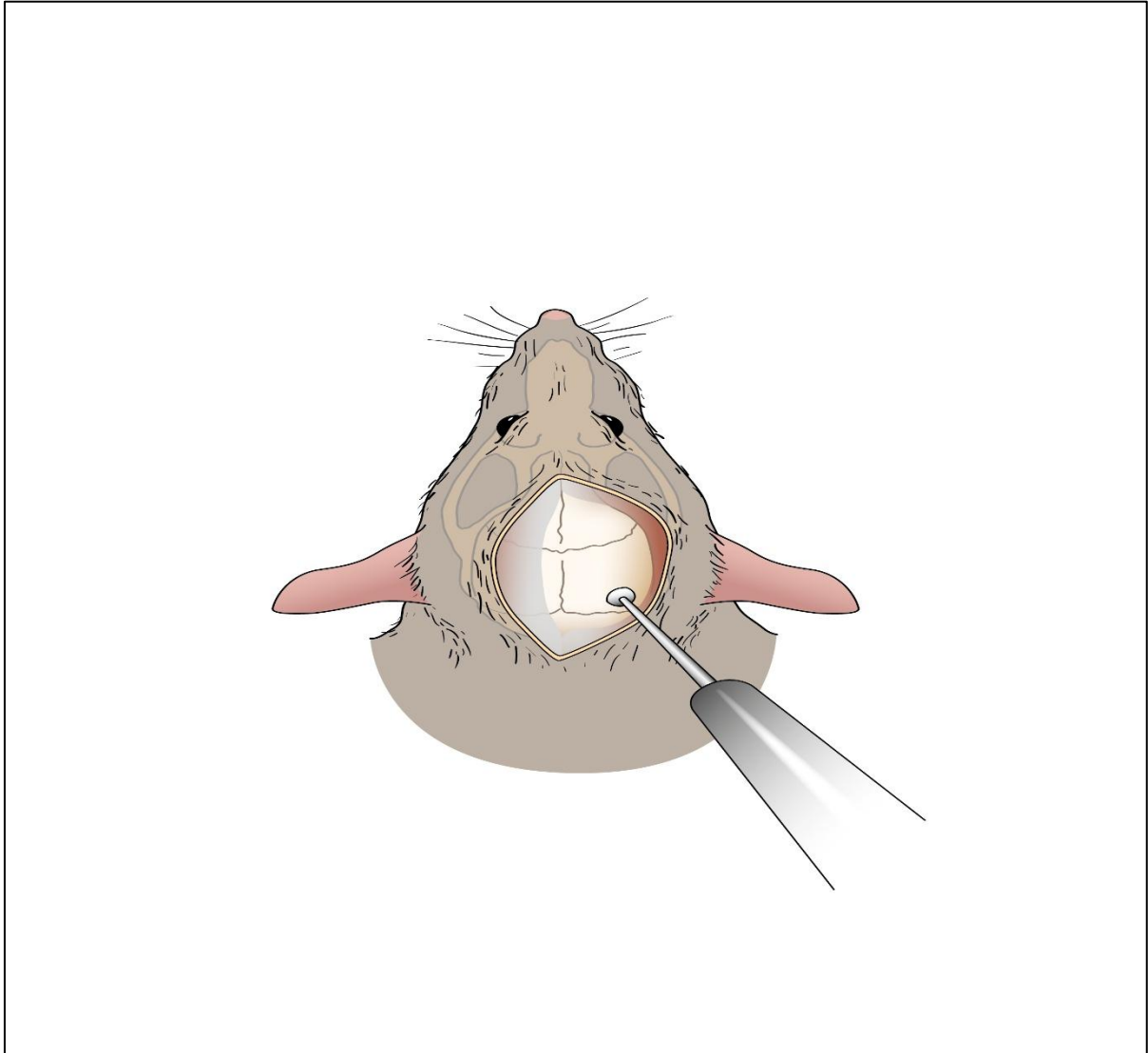


Abbildung 3 Eröffnung der Schädelkalotte mittels einer Fräse

In der Aufsicht erkennt man das frei präparierte Os parietale und weiter rostral das Os frontale. Durch Einsatz der Fräse wird ein Loch in Höhe der Linea temporalis gebohrt.

4. Anlage der Hirndrucksonde

Die Lagerung des Versuchstieres erfolgt immer noch in der Prone Position und in der Aufsicht lässt sich das Bohrloch erkennen. Über dieses wird nun die Hirndrucksonde eingebracht.

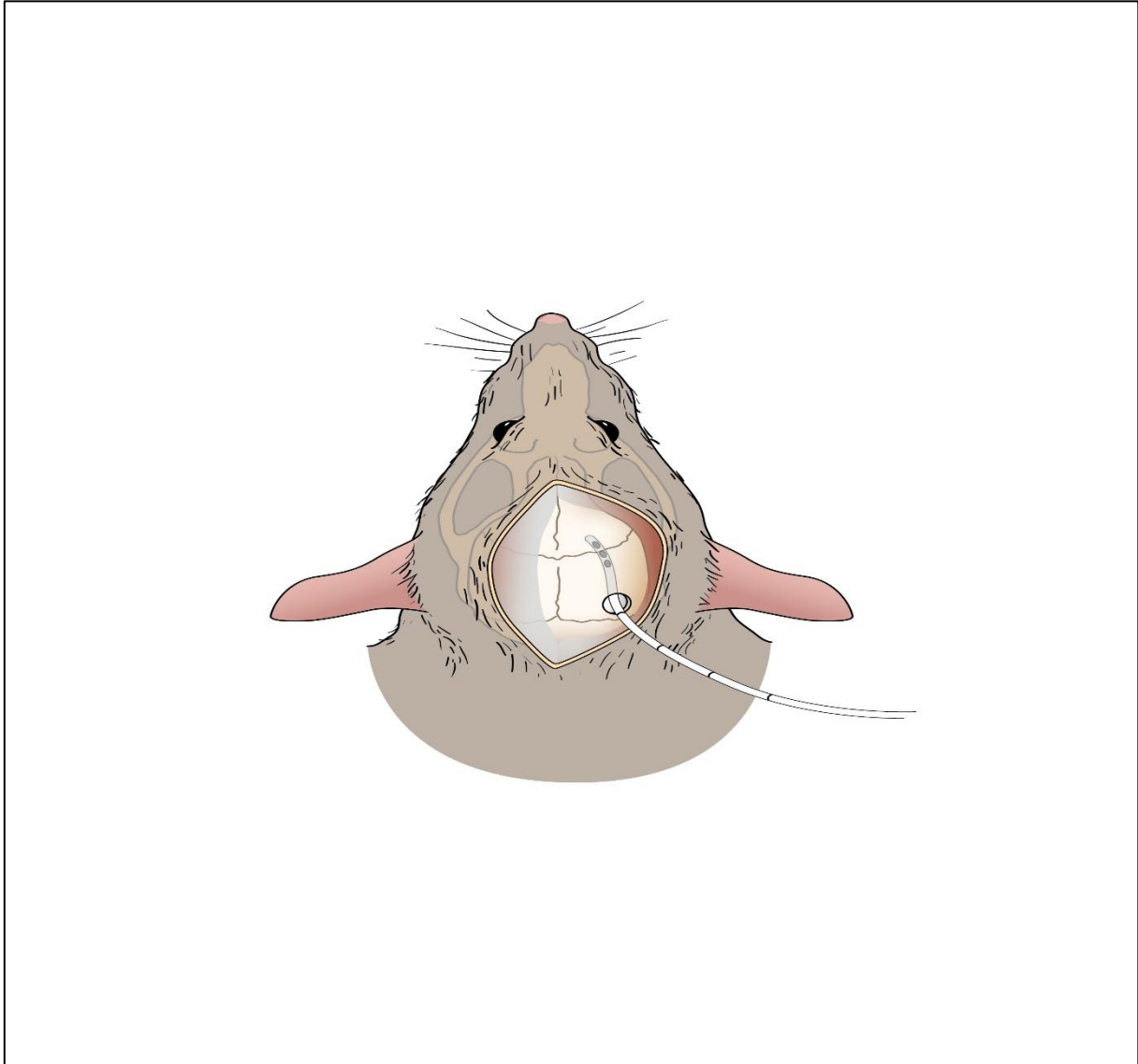


Abbildung 4 Anlage der Hirndrucksonde

In der Aufsicht erkennt man die in das Bohrloch eingebrachte Hirndrucksonde

5. Fixierung der Hirndrucksonde

Die Hirndrucksonde wird nun mit einem Zahnzement (Zink- Polycaboxylat Zement) fixiert, um ein Herausgleiten der Sonde bei den weiteren Lagerungsschritten und anderen Manipulationen während der Operation zu verhindern.

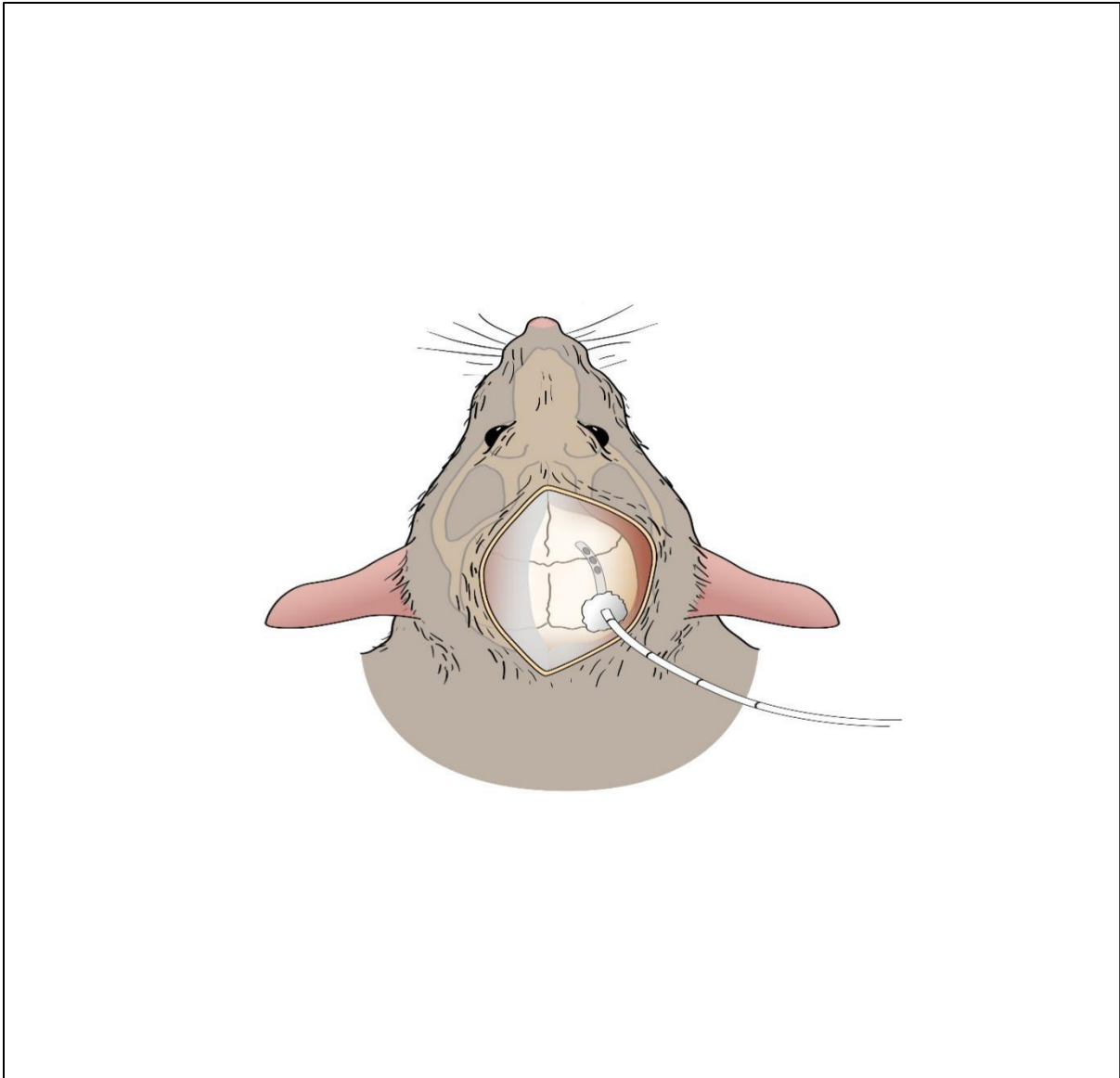


Abbildung 5 Fixierung der Hirndrucksonde

Die Hirndrucksonde wird fixiert. Dafür wird das Bohrloch mit einem Poly- X- Plus Zahnzement verschlossen.

6. Eröffnung des Collums und Präparation der A. carotis im Verlauf

Das Versuchstier wird nun in Rückenlagerung gedreht und an den Extremitäten fixiert. Es folgt die Schnittsetzung entlang der Medianlinie des Collums. Es erscheinen die prominent angelegten Gll. submandibulares, welche nach lateral verlagert werden. Es wird nun die Carotisgabel mit A. carotis communis, A. carotis interna sowie A. carotis externa dargestellt.

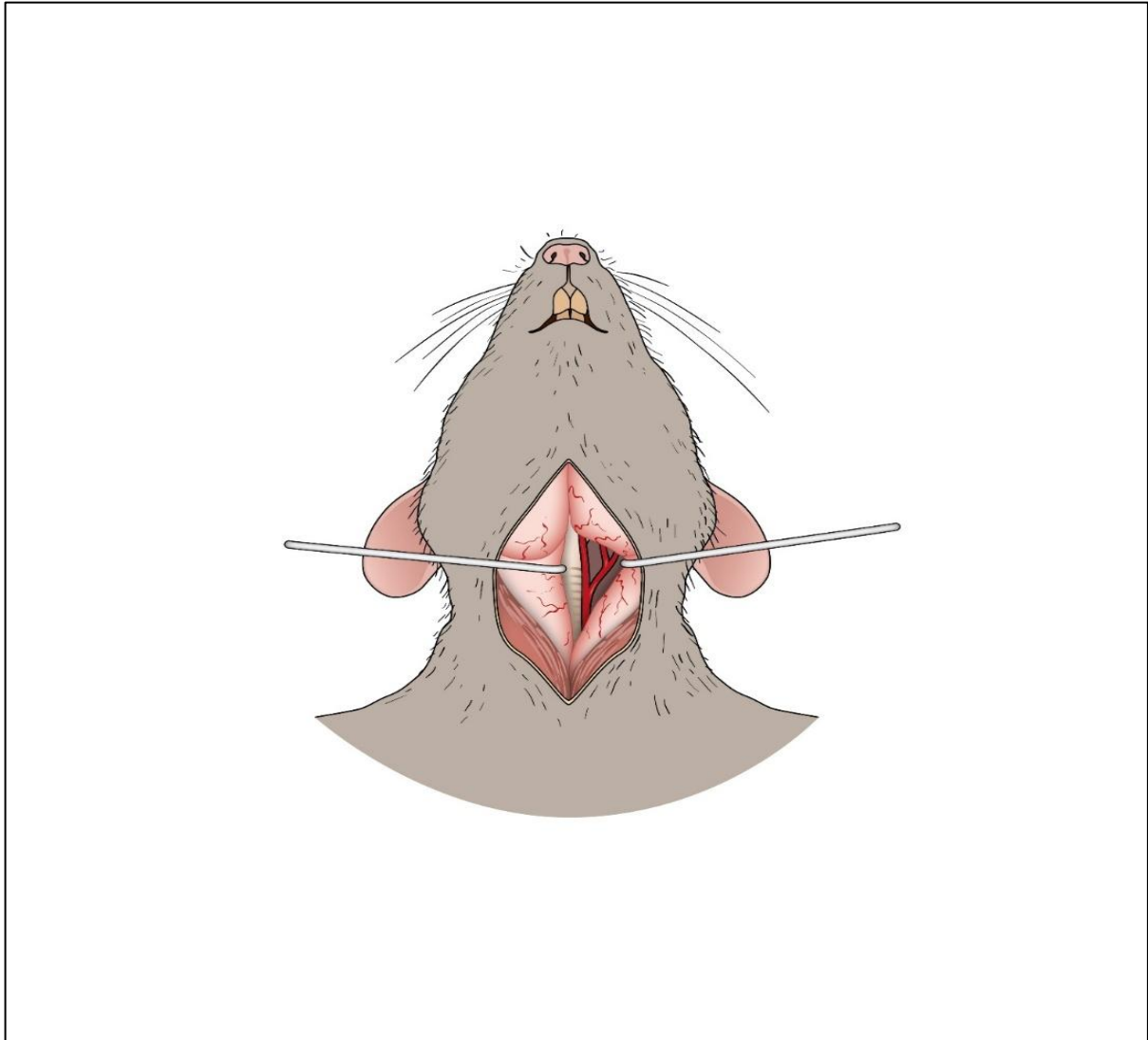


Abbildung 6 Präparation der Carotisgabel

Nach der Eröffnung des Collums wird die Carotisgabel präpariert und dargestellt.

7. Anlage der Ligaturen und Clips

Es werden zwei Ligaturfäden (1.&2.) gesetzt, um die Durchblutung innerhalb der A. carotis externa für die nachfolgende Schnittsetzung zu unterbinden. Der erste Ligaturfaden wird distal gesetzt und direkt zugezogen. Die zweite Ligatur wird weiter proximal gesetzt und noch nicht zugezogen. Des Weiteren werden die A. carotis interna, sowie die A. carotis communis temporär geklippt (3.& 4.).

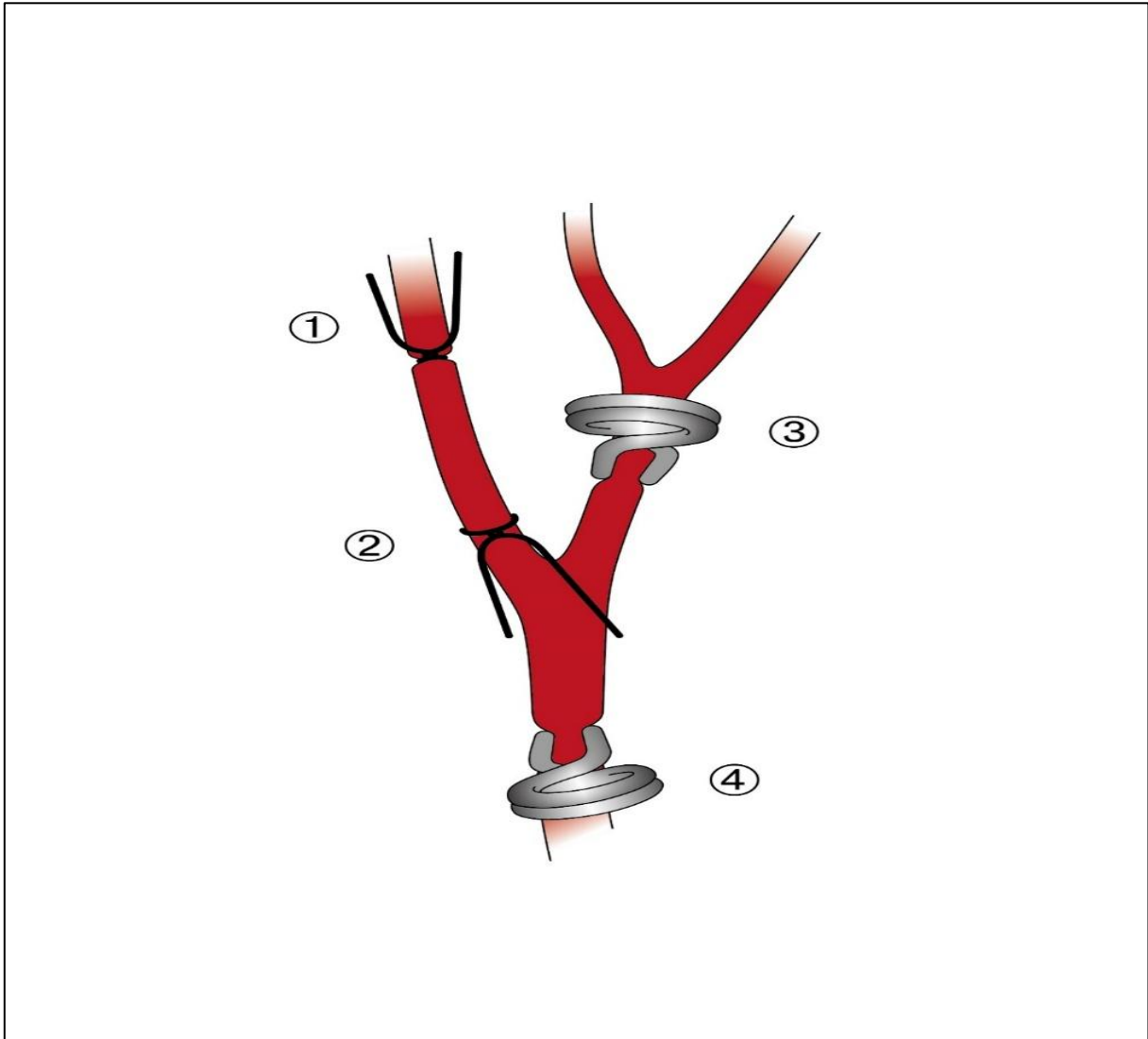


Abbildung 7 Anlage von Clips und Ligaturen entlang der A. carotis interna und externa

Der Blutfluss über die A. carotis ext. wird über das Anbringen von Ligaturen (1 & 2) unterbunden, wobei die proximale Ligatur noch nicht zugezogen wird. Die A. carotis communis und A. carotis int. werden temporär geklippt.

8. Eröffnung der A. carotis externa zwischen den beiden Ligaturen

Die A. carotis externa wird zwischen den beiden Ligaturfäden eröffnet. Die zuvor gesetzten Klips auf der A. carotis communis verhindern einen Blutverlust.

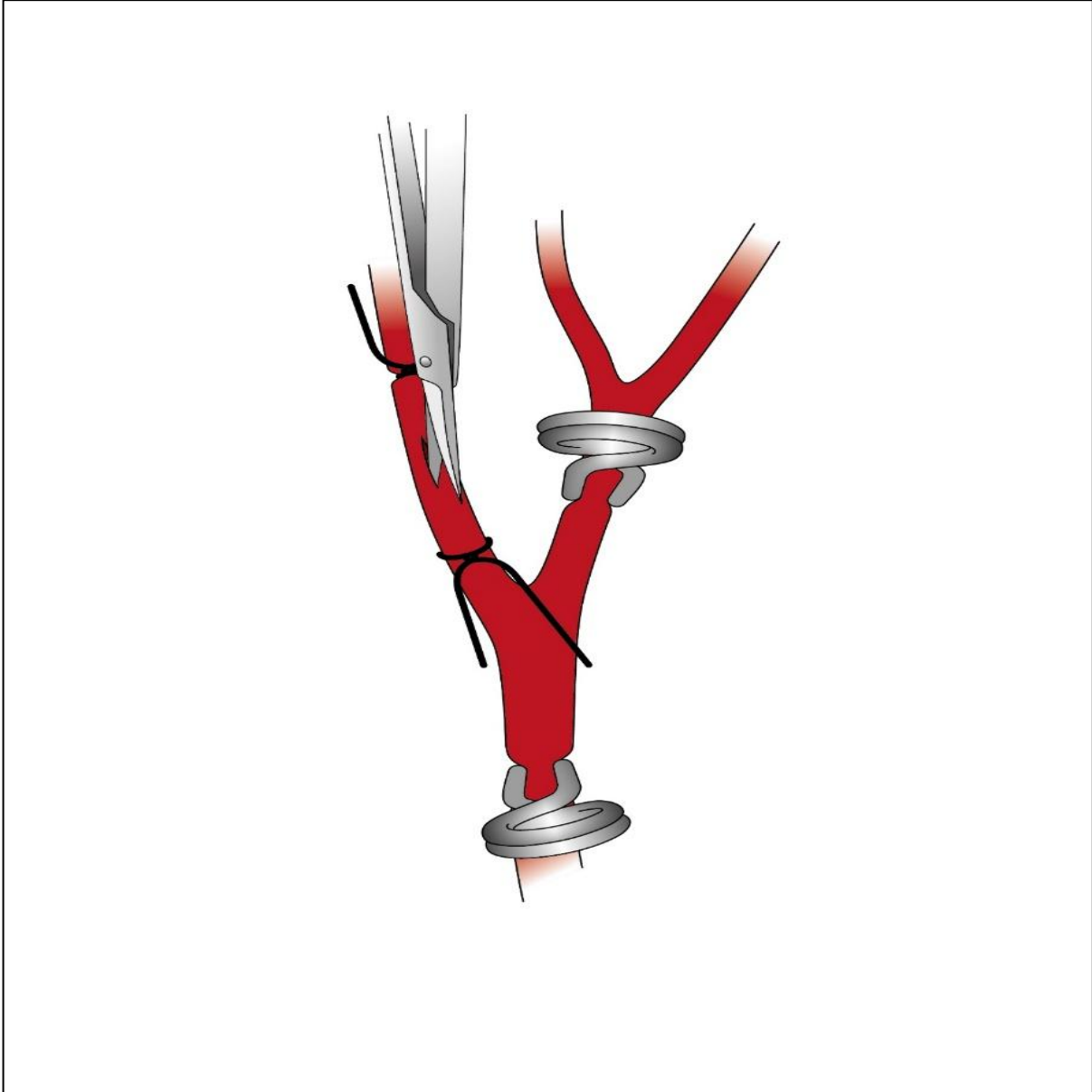


Abbildung 8 Eröffnung der A. carotis externa

Die A. carotis externa wurde bereits im vorherigen Schritt mit zwei Ligaturen versorgt. Zwischen diesen beiden Ligaturen wird nun das Gefäß eröffnet, um im Anschluss den Perforationsfaden einführen zu können. Die proximal gelegene Ligatur wird noch nicht zugezogen.

9. Insertion eine 5,0 Prolenefaden

Der 5,0 Prolenefaden wird nun über den zuvor durchgeführten Schnitt entlang der A. carotis externa bis zur Gefäßgabel eingeführt.

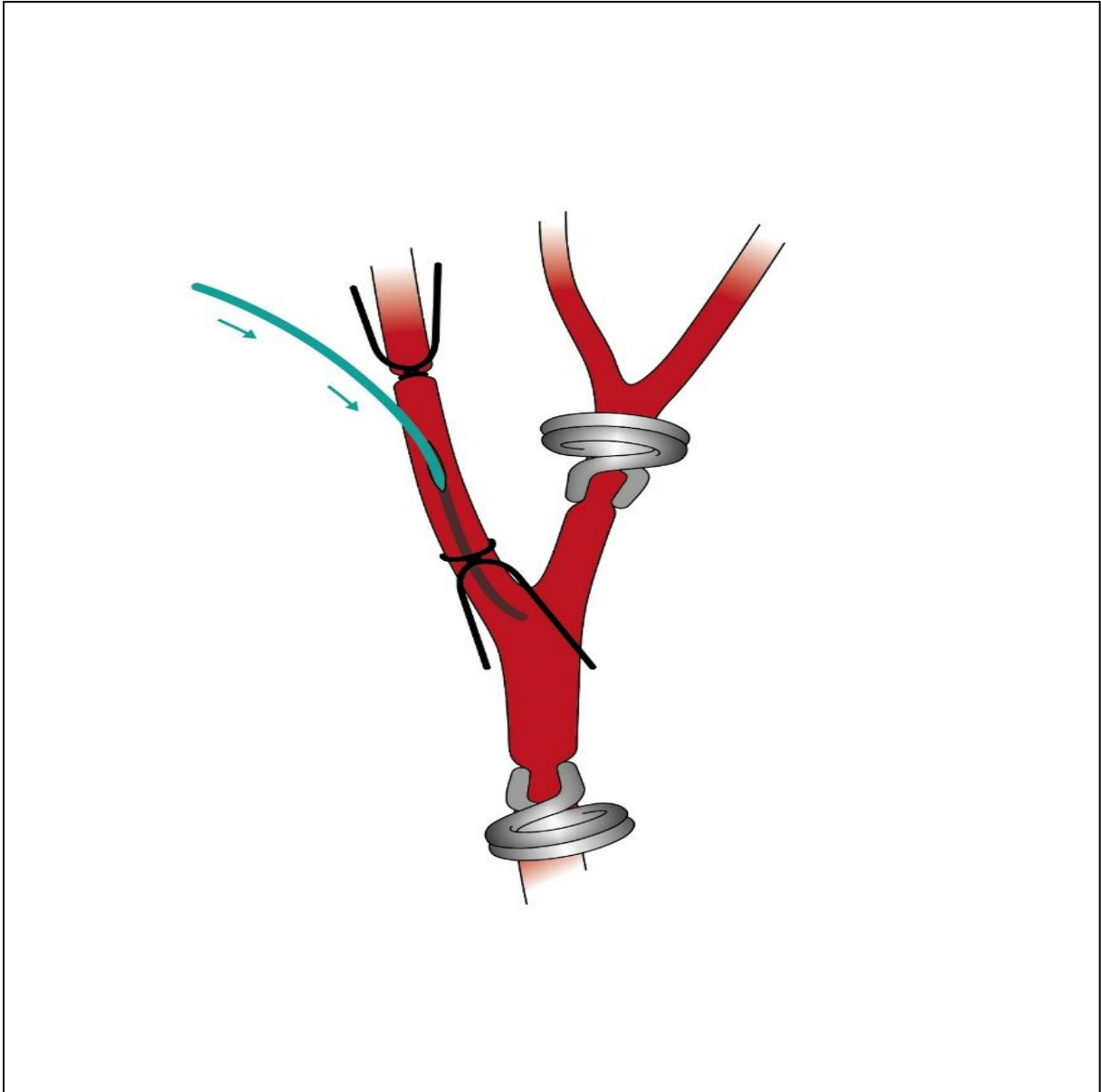


Abbildung 9 Einführen des Prolenefadens

Der 5,0 Prolenefaden wird über den Schnitt in der A. carotis externa nach proximal eingeführt und vorsichtig bis zur Carotidgabel vorgeschoben.

10. Fixierung des 5,0 Prolenefadens

Der durch den Schnitt in der A. carotis externa eingebrachte und bis zur Carotisgabel vorgeschobene Prolenefaden wird nun durch das Zuziehen der proximalen Ligatur fixiert. Dies hält einmal den Faden an der zunächst gewünschten Position und unterbindet darüber hinaus den Blutfluss zwischen den beiden Ligaturen.

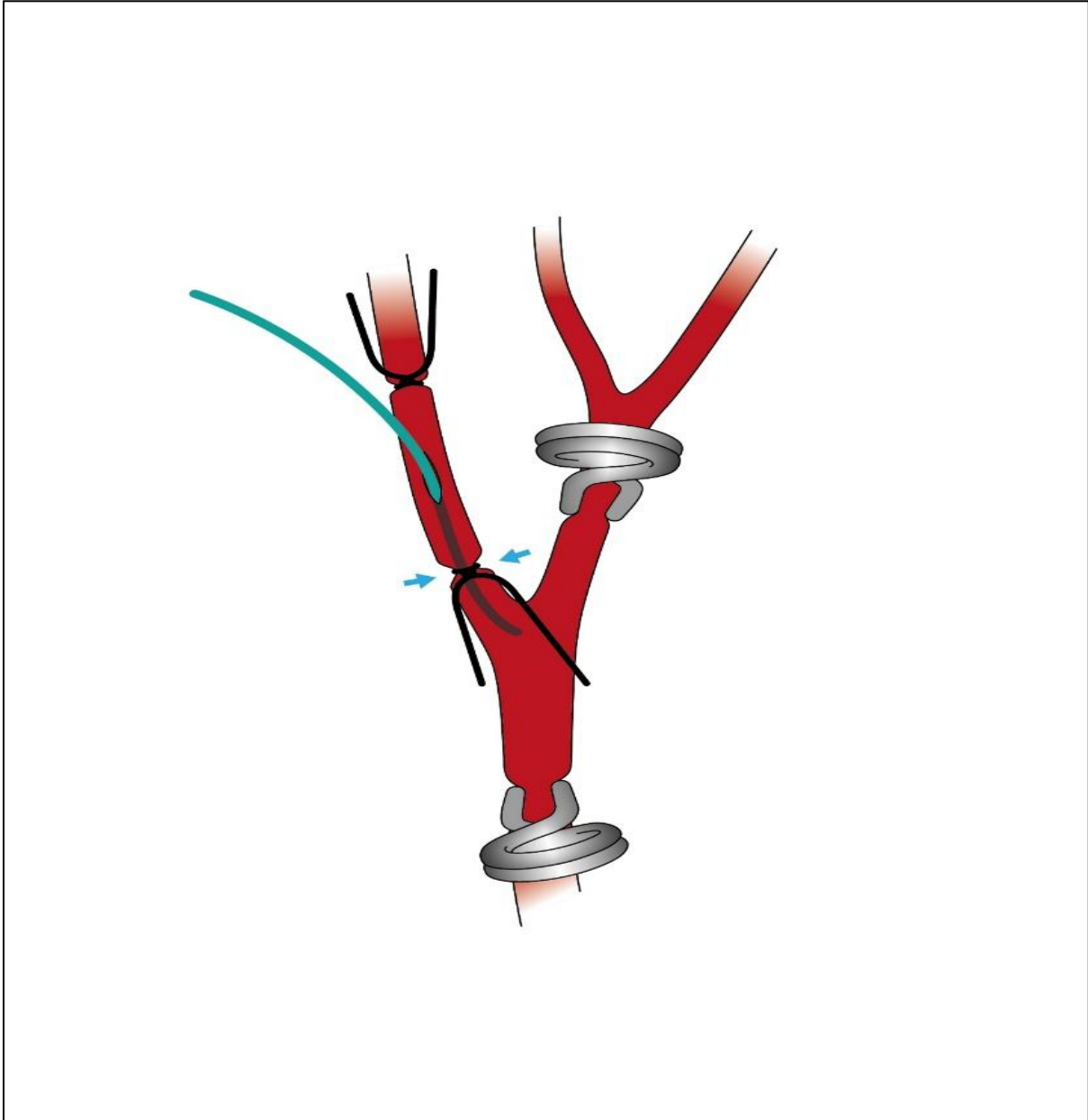


Abbildung 10 Fixierung des Prolenefadens

Der 5,0 Prolenefaden wird durch das Zuziehen der proximalen Ligaturen fixiert, wodurch ebenfalls der Blutfluss zwischen den beiden Ligaturen unterbunden wird.

11. Entfernung der Clips

Die Clips auf der A. carotis communis und der A. carotis interna werden entfernt, um den Blutfluss wiederherzustellen. Die Perfusion der A. carotis interna wird somit wieder gewährleistet

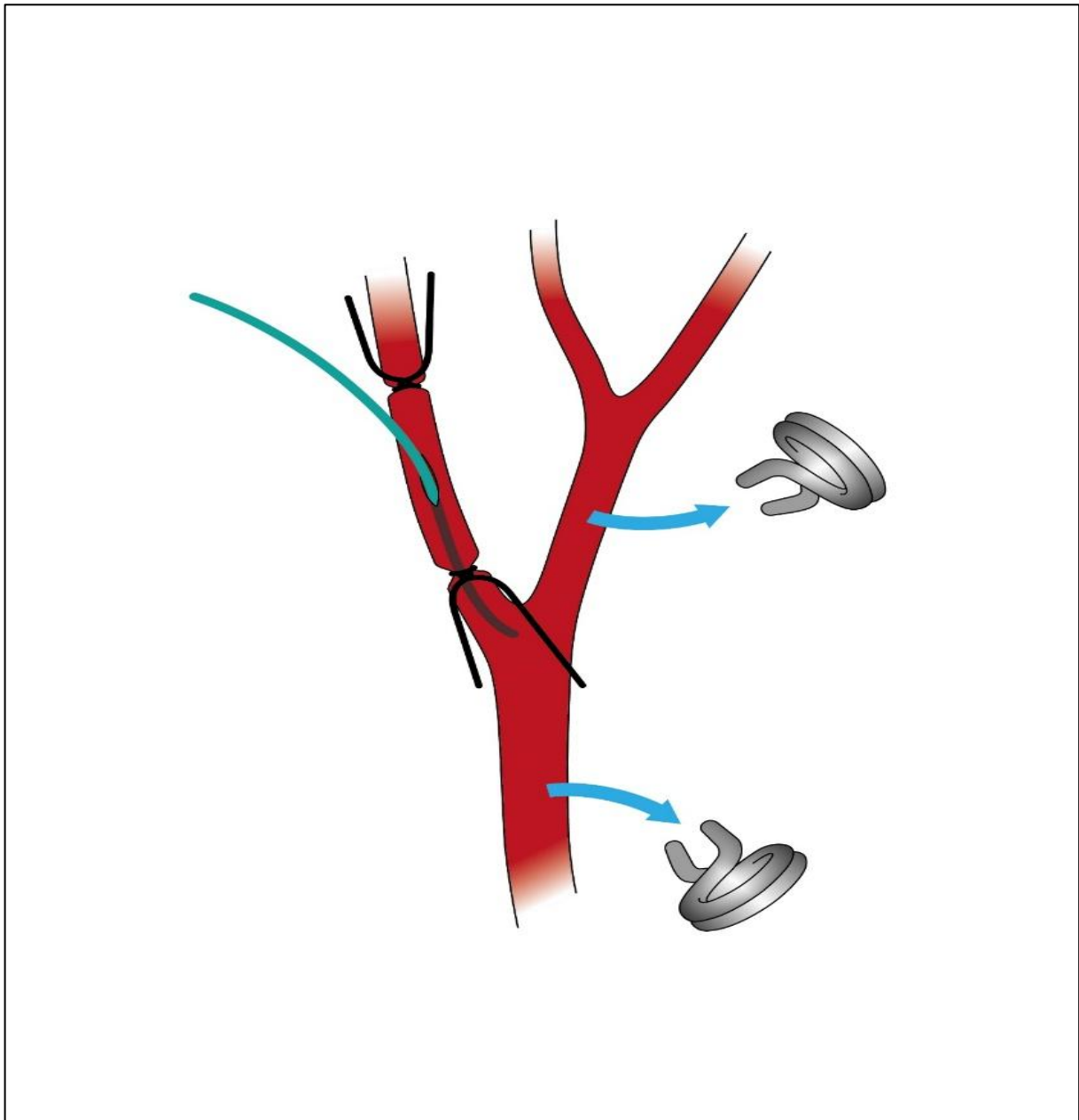


Abbildung 11 Entfernung der Clips auf der A. carotis interna und A. carotis communis
Die Clips auf den beiden Gefäßen werden entfernt, wodurch der Blutfluss wiederhergestellt wird.

12. Durchtrennung der A. carotis externa

Die A. carotis externa wird zwischen den beiden Ligaturen durchtrennt, wodurch ein mobilisierbarer proximaler Gefäßstumpf entsteht. Die beiden Ligaturen werden belassen.

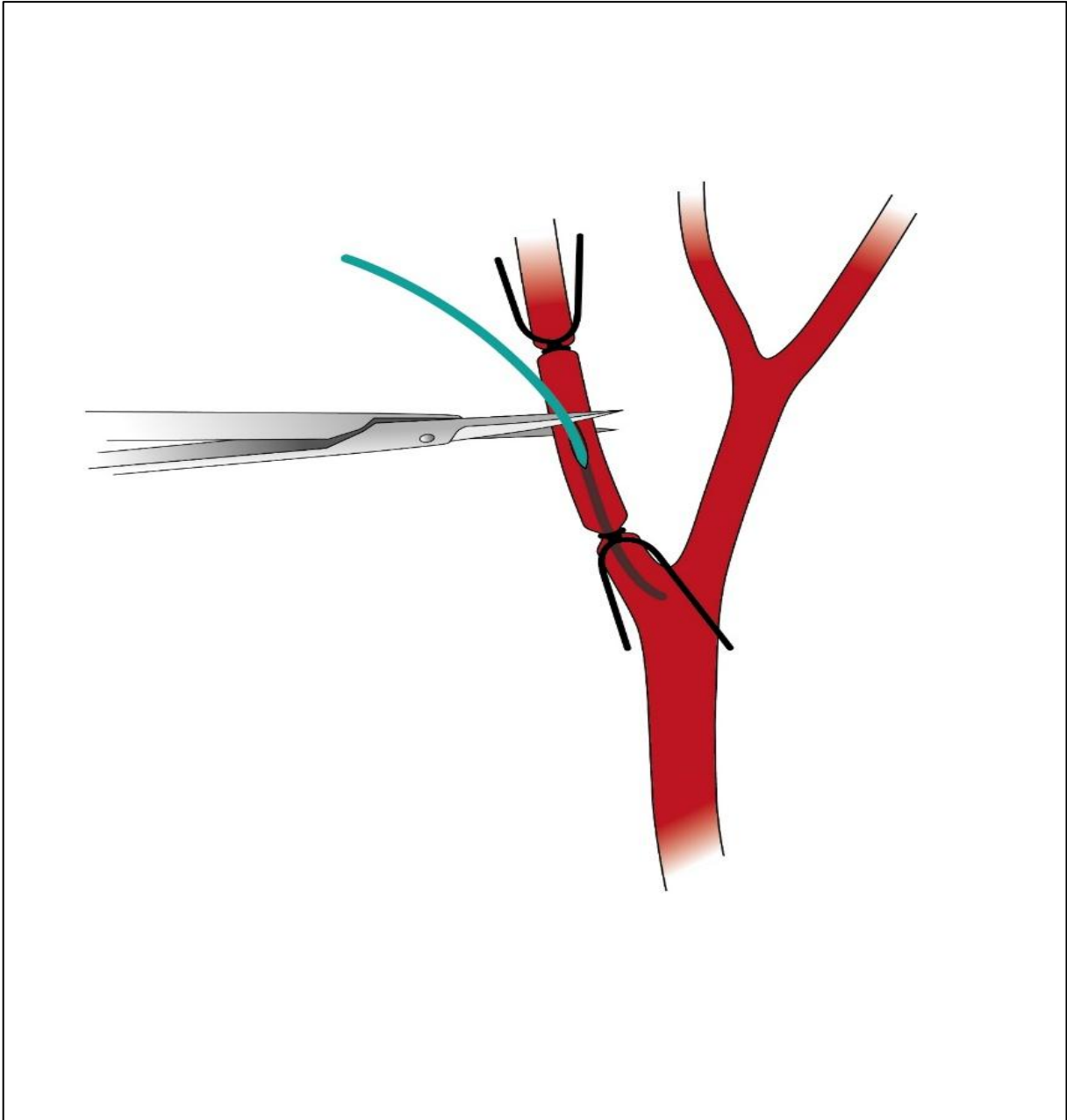


Abbildung 12 Durchtrennung der A. carotis externa

Die A. carotis externa wird zwischen den beiden Ligaturen durchtrennt, ohne dabei den Prolenefaden zu beschädigen.

13. Induktion der Subarachnoidalblutung durch den Prolenefaden

Der Gefäßstumpf der A. carotis externa wird nach kaudal geklappt wodurch der 5,0 Prolenefaden nun in die A. carotis int. weiter vorgeschoben werden kann, um die SAB mittels einer Gefäßperforation durch den Prolenefaden zu induzieren. Hierbei ist zu beachten, dass sich distal der Carotisgabel ein extrakranieller Gefäßabgang der A. carotis interna befindet. Der Prolenefaden muss zur Induktion der Subarachnoidalblutung in das nach intrakraniell ziehende Gefäß eingeführt werden. Der Anstieg des ICPs dient als Parameter für die erfolgreiche intrakranielle Gefäßperforation.

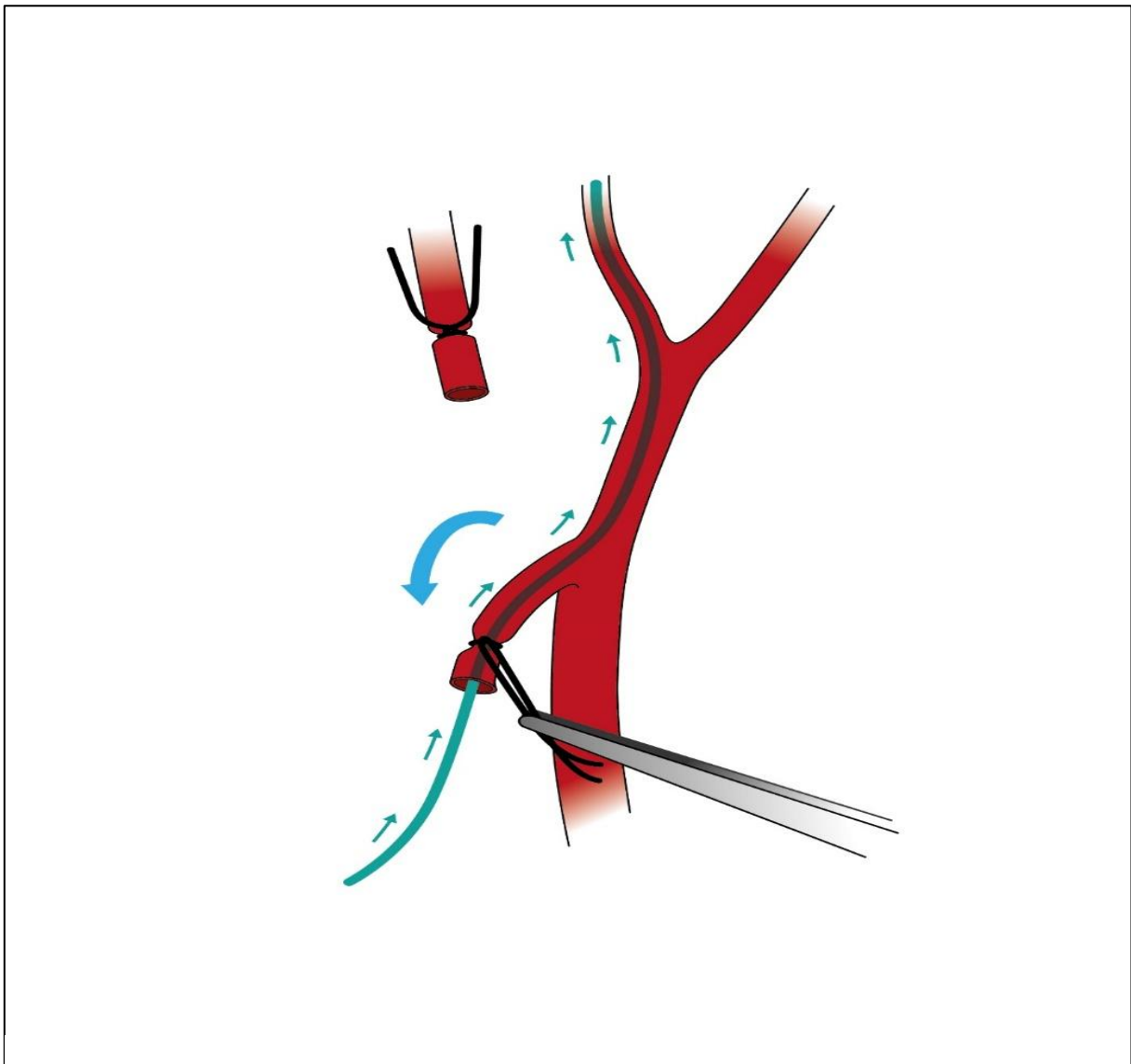


Abbildung 13 Induktion der SAB

Der Gefäßstumpf wird nach kaudal mobilisiert und der Prolenefaden nach intrakraniell vorgeschoben, um die SAB zu induzieren.

14. Nahtsetzung und Nachversorgung

Der 5,0 Prolenefaden wird nach Induktion der SAB wieder entfernt. Die Ligaturfäden müssen zur Vermeidung einer Blutung belassen werden. Die Wunde wird mit einer Hautnaht verschlossen. Anschließend wird das Versuchstier wieder in Bauchlage versetzt, die Hirndrucksonde sowie der Zement sorgfältig entfernt und auch diese Wunde mit einer Hautnaht verschlossen. Zur unmittelbaren Überwachung des Narkoseendes wird das Versuchstier mit ausreichend Futter und Wasser in einem warmen Umfeld platziert, bis die Motorik wieder komplett hergestellt ist. Zur Schmerztherapie erfolgen regelmäßige Gaben von Buprenorphin.

Um eine ausreichende Vergleichbarkeit zwischen den jeweiligen Gruppen zu gewährleisten, wurde bei jedem Tier die gleiche operative Abfolge eingehalten. Bei der Sham- Vergleichsgruppe wurde jedoch der Faden nur über die A. carotis externa in die A. carotis interna vorgeschoben. Eine Blutung durch Gefäßperforation wurde nicht ausgelöst. Als Parameter für die erfolgreiche Gefäßperforation diente der gemessene ICP Anstieg.

Am Versuchsende erfolgte die standardisierte Asservierung aller Hirnpräparate. Die Versuchstiere wurden in tiefer Narkose nach einer Blutabnahme mit einer kalten physiologischen Salzlösung perfundiert, anschließend dekapitiert und die Hirnpräparate auf Trockeneis schockgefroren.

15. SAB- Induktion und Hirndruck

Der Hirndruck wurde während der operativen Induktion der SAB durchgehend gemonitort und stieg mit der SAB- Induktion auf etwa 80mmHg im Median an. Im Anschluss kam es zu einem Abfall des Hirndrucks. Diese Grafik ist als eine beispielhafte Illustration des Hirndruckverlaufes zu sehen. Der Anstieg des ICP wurde hier als Indikator für die erfolgreiche Induktion einer SAB gewertet. Darüber hinaus ließ sich in der SAB-Gruppe in allen Fällen ein subarachnoidales Hämatom beobachten, wohingegen dieses bei der Sham Gruppe nicht zu beobachten war.

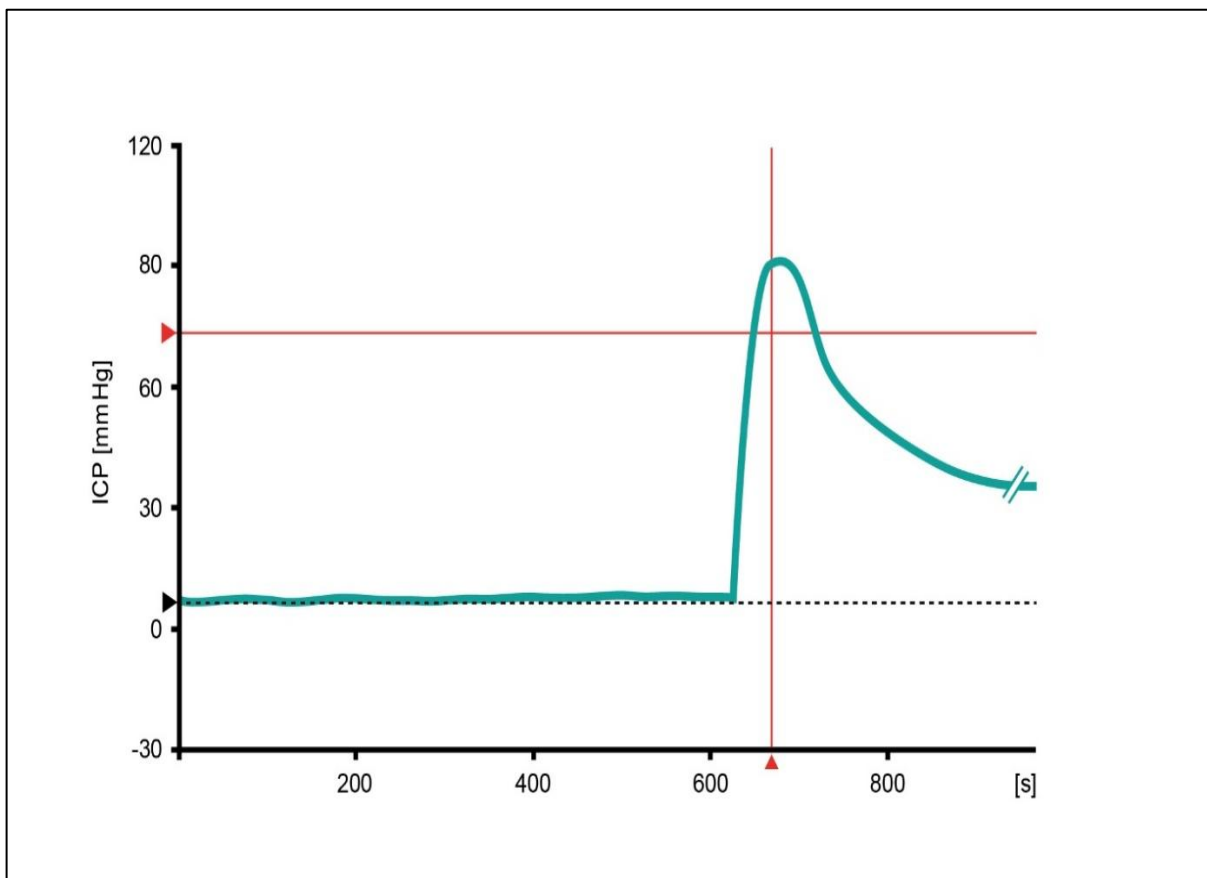


Abbildung 14 Schematischer Verlauf des Hirndrucks während der SAB- Induktion im Fadenperforationsmodell

Der Verlauf des ICP wurde während der gesamten Operation mittels der zu Beginn platzierten Hirndrucksonde überwacht. Hier zu erkennen ist der initiale Anstieg des ICP nach der SAB- Induktion und das nachfolgende Abfallen auf hochnormale Werte.

3.6. Histologische Färbungen

3.6.1. IgG- Färbung

Reagenzien:

- PFA 4 %
 - o - 235ml Aqua dest. auf 70° erhitzen
 - o 18,8g Paraformaldehyd zufügen
 - o 0,47ml 10M NaOH zufügen
 - o 235ml 0,2M Phosphatpuffer zusammen mit der Lösung filtrieren
- PBS: 9,5g auf 1L Aqua dest.
- Triton X, Sigma Aldrich, 4°C
- H₂O₂ 30%, Roth 4°C
- 1°AK: Goat-anti-mouse IgG-HRP, SC- 2031, Santa Cruz, 4°C
- Vecastain ABC Komplex, Vector 4°C
- DAB, DAKO 4°C
- Roti- Histol, Roth
- Roti- Histokitt, Roth

Zunächst werden die ausgewählten Schnittpräparate luftgetrocknet und mit Dako Pen umrandet, um eine lipophile Randschicht um die Präparate zu erstellen, welche die Reagenzien vor dem Wegfließen hindert. Des Weiteren kann dadurch Antikörper gespart werden. Im nächsten Schritt werden die Präparate, unter einem Abzug, 10 min in PFA 4 % gelegt und anschließend 3x für jeweils 5min in PBS gewaschen. Die Objektträger werden nun aufgereiht und für jeweils 3min mit H₂O₂ geblockt (OT). Nach einer erneuten Waschung in PBS für 5min werden die Objektträger für 1,5h mit dem 1° Antikörper, welcher im Verhältnis 1:500 in PBST gelöst wird, bei Raumtemperatur inkubiert (OT). Nach Ablauf der 1,5h werden die Objektträger erneut 3-mal für 5min in PBS gewaschen und für 30min mit dem ABC-Komplex inkubiert (OT). Für das Ansetzen des ABC-Komplexes werden jeweils zwei Tropfen A und B in 5ml PBST gelöst. Es folgt eine erneute zweimalige, jeweils 5min andauernde Waschung in PBS, welcher sich die Anwendung von DAB anschließt. Hierfür wird 1 Tropfen DAB in 1ml Puffer gelöst und für 75 Sekunden auf die Objektträger getropft (OT). Nach erneuter dreimaliger Waschung für jeweils 5min in PBS erfolgt die Dehydrierung in Isopropanol mit ansteigender Konzentration (erst in 70% iger-, dann 80% iger- und schließlich 100% iger Lösung für jeweils 2min). Zum Schluss werden die Proben einmal 5min dann 3min in Roti- Histol gegeben, um sie anschließend mit einem Roti Histo Kitt zu

verdeckeln. Zu beachten ist, dass die Proben für etwa 24h unter dem Abzug abtrocknen sollen. Alle Arbeitsschritte, welche mit OT versehen sind, erfolgen mittels Pipettieren der angegebenen Reagenzien in einer Feuchtkammer, wobei ca. 100 μ l auf etwa 2 Schnitte gegeben werden. Die restlichen Arbeitsschritte erfolgen mit einer Küvette unter Zuhilfenahme eines Schüttlers.

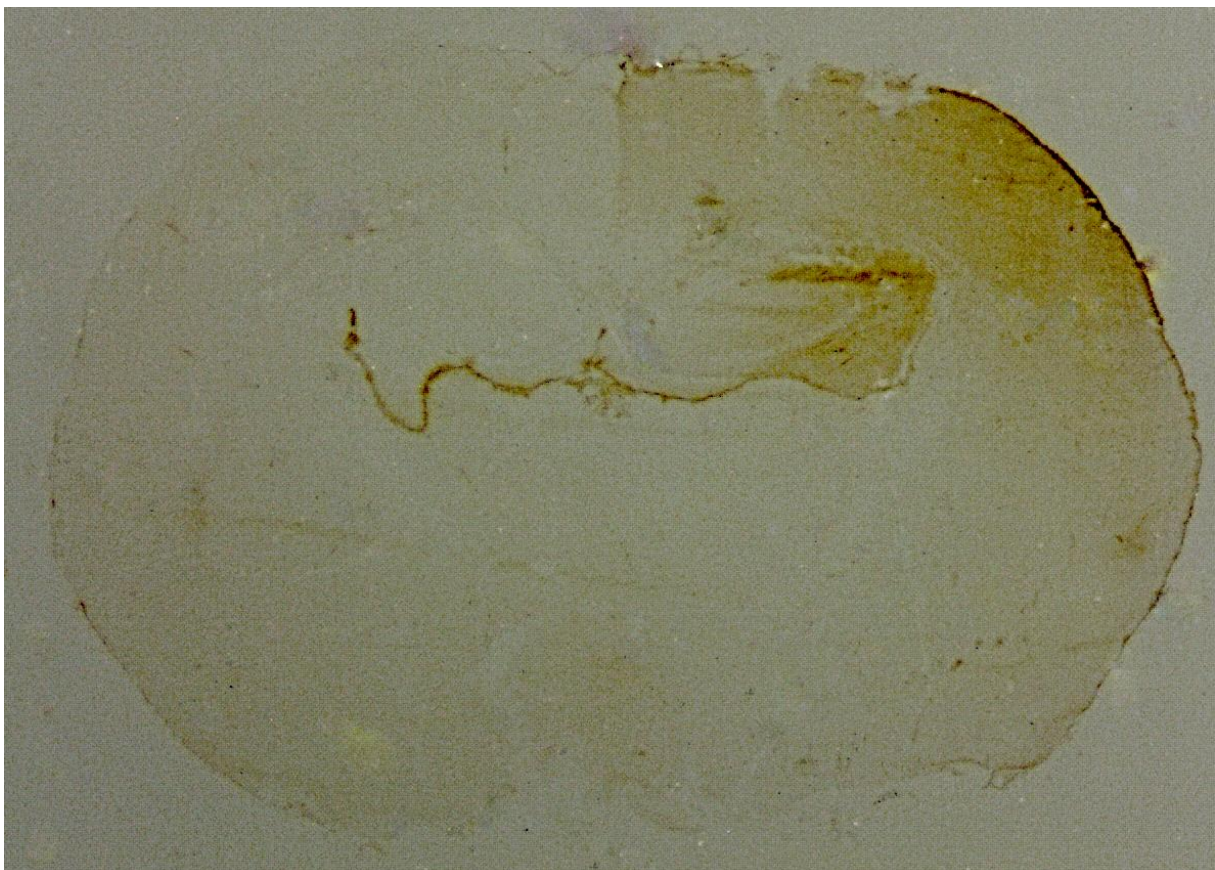


Abbildung 15 Exemplarisches Präparat nach IgG Färbung

3.6.2. Nissl Färbung

Reagenzien:

- Aqua dest.
- 70% Ethanol (AppliChem)
- 96% Ethanol (AppliChem)
- 100% Ethanol (AppliChem)
- 5g Kresylviolett als Färbelösung (Merck,25g,RT)
- Roti Histol (Roth 1I)

Die Kryostatschnitte werden zunächst aus dem Kühlfach genommen und für eine Stunde getrocknet. Parallel dazu werden 100ml Ethanol 100% mit 400ml Aqua dest für 30 Minuten bei 50°C durch einen Magnetrührer vermischt. Anschließend wird die Lösung für ca. 4 Stunden filtriert.

Nach dem Trocknen der Schnitte werden diese für zwei Minuten in 70% Ethanol gegeben und anschließend für 10 Minuten in Kresylviolettlösung getaucht. Im Anschluss erfolgt das kurze Eintauchen in Aqua dest., dann in Ethanol 70%, dann in Ethanol 96% und abschließend in die 100 % Ethanol Lösung. Als letztes werden die Objektträger einmal für 5 Minuten und erneut für 2 Minuten in Roti Histol eingelegt.



Abbildung 16 Exemplarisches Präparat nach Nissl Färbung

3.7. Mikroskopische Analyse und Dokumentation

Alle auf den jeweiligen Objektträgern fixierte Schnitte wurde einheitlich mit dem Stand K Lab Mikroskop (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Göttingen, Deutschland) analysiert. Lichtassoziierte Störquellen wie Schattenbildung oder Unterbelichtung konnten mit der integrierten LED-Beleuchtung minimiert werden. Die Analyse und Dokumentation der Proben erfolgten in einem 1,2:2 Zoom Verhältnis. Über die integrierte AxioCam 105 color sowie die dazugehörige Software (ZEN 2 light imaging software 2.0.0.0, Carl Zeiss Microscopy GmbH, Göttingen, Deutschland) konnten alle Schnittbilder nach dem gleichen Standard dokumentiert und ausgewertet werden. Die Nissl Färbung diente als Übersichtsfärbung. Bezüglich der IgG Färbung wurde zunächst die Gesamtfläche der rechten Hemisphäre als Referenz bestimmt. Anschließend wurde die Gesamtfläche der linken Hemisphäre als Äquivalent bestimmt. Das Areal mit erhöhter IgG Immunofluoreszenz wurde bestimmt und ins Verhältnis zur Gesamtfläche der linken Hemisphäre gesetzt, woraus sich die prozentuale Schadensfläche ergab.

4. Statistik

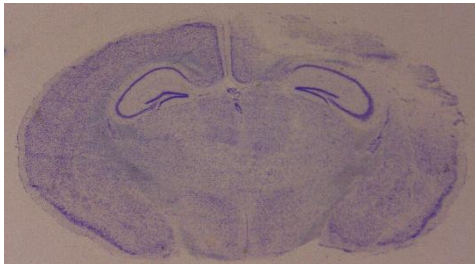
Für alle statistischen Analysen und Aufarbeitungen wurde die Version 12.5 von Sigma Plot (Systat Software Inc., San Jose, CA, USA) verwendet. Die Mittelwerte der einzelnen experimentellen Gruppen und Untergruppen wurden untereinander mittels des Mann-Whitney U Testes verglichen und auf statistische Signifikanz überprüft. Alle Ergebnisse mit einem $p < 0,05$ wurden als statistisch signifikant gewertet. Alle Daten sind als Mittelwert \pm Standardfehler angegeben. Die Auswahl der Gruppengrößen für die experimentellen Vergleichsgruppen erfolgte auf Basis einer Poweranalyse mit Sigma Plot mit einem Alpha Wert von 0,05 und einer Power von 0,8. Es wurde keine Korrektur für multiples Testen durchgeführt, da nur Einzelparameter untereinander verglichen wurden.

5. Ergebnisse

5.1. Mikroskopische Aufarbeitung der Präparate

Alle Proben wurden in der gleichen Art wie unter 3.8. analysiert. Ausgemessen wurde zunächst die gesamte Hirnfläche in mm^2 , anschließend die linke Hemisphäre in mm^2 . Zuletzt wurde bei jedem Präparat die Schadensfläche der linken Hemisphäre in mm^2 ausgemessen, also das schrankengestörte Areal mit IgG Fluoreszenz, und mit der Gesamtfläche der jeweiligen Hemisphäre in ein prozentuales Verhältnis gesetzt.

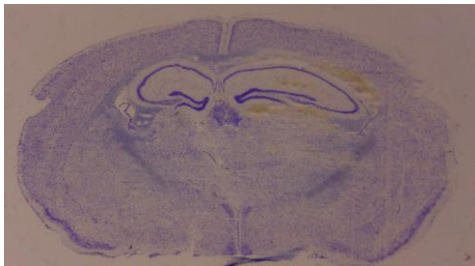
Nissl Färbung Placebogruppe



IgG Färbung Placebogruppe



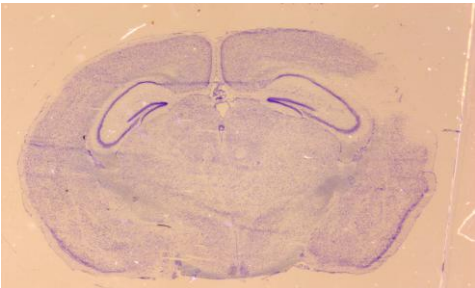
Nissl Färbung Neutropeniegruppe



IgG Färbung Neutropeniegruppe



Nissl Färbung Shamgruppe



IgG Färbung Shamgruppe

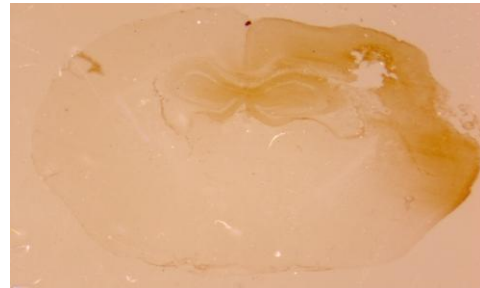


Abbildung 17 Nissl und IgG Färbung in der 15 Minuten Gruppe

Jeweils ein Nissl Bild im Gegensatz zu einer IgG Färbung in der Sham sowie in der Neutropenie Gruppe. Aufteilung in die drei Gruppen nach 15min

Nissl Färbung Placebogruppe



IgG Färbung Placebogruppe



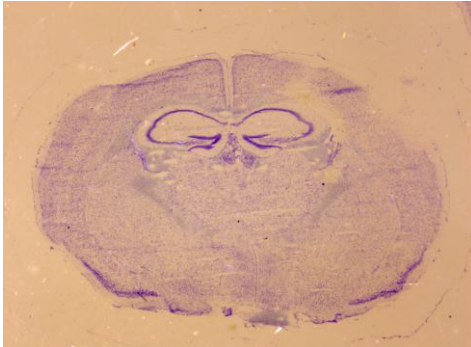
Nissl Färbung Neutropeniegruppe



IgG Färbung Neutropeniegruppe



Nissl Färbung Shamgruppe



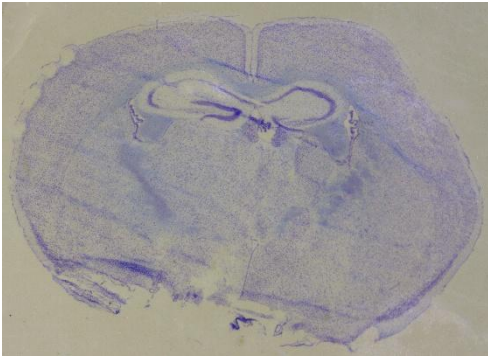
IgG Färbung Shamgruppe



Abbildung 19 Nissl und IgG Färbung in der 3 Stunden Gruppe

Jeweils ein Nissl Bild im Gegensatz zu einer IgG Färbung in der Sham sowie in der Neutropenie Gruppe. Aufteilung in die drei Gruppen nach 3 Stunden

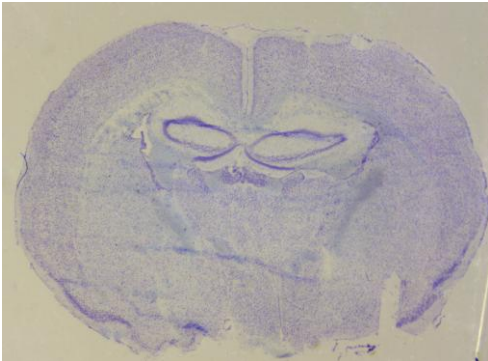
Nissl Färbung Placebogruppe



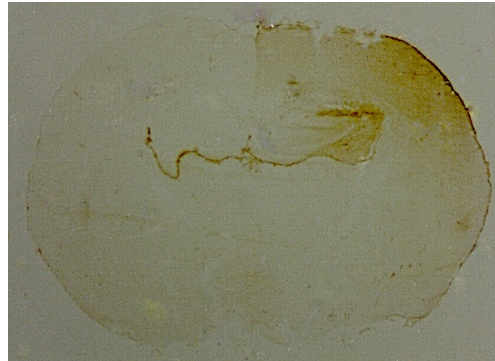
IgG Färbung Placebogruppe



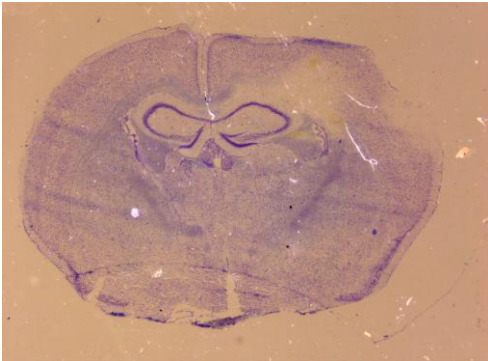
Nissl Färbung Neutropeniegruppe



IgG Färbung Neutropeniegruppe



Nissl Färbung Shamgruppe



IgG Färbung Shamgruppe

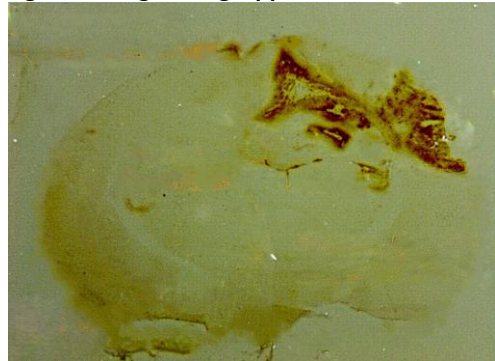


Abbildung 20: Nissl und IgG Färbung in der 24 Stunden Gruppe

Jeweils ein Nissl Bild im Gegensatz zu einer IgG Färbung in der Sham sowie in der Neutropenie Gruppe. Aufteilung in die drei Gruppen nach 24 Stunden

5.2. Charakteristika der randomisierten Gruppen

Von den insgesamt 51 Tieren überlebten in der SAB-Neutropenie Gruppe 15 von insgesamt 18 Tieren. Die Mortalität unterschied sich hierbei nicht unter den jeweiligen Subgruppen. In der 18 Tiere umfassenden SAB-Placebogruppe verstarben 1 Tier in der 15min Subgruppe, 2 Tiere in der 3h Subgruppe und ein Tier in der 24h Subgruppe. In der neu hinzugefügten Placebogruppe verstarb kein Tier.

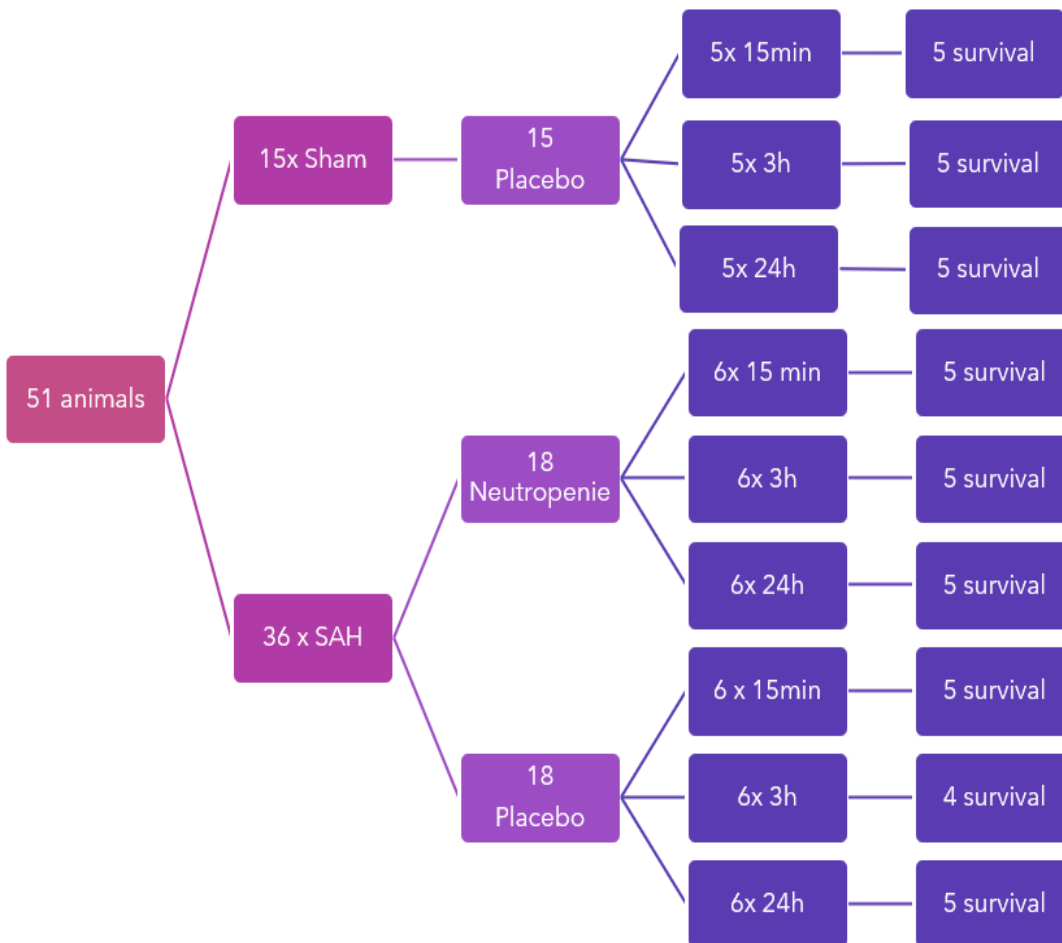


Abbildung 21 Überlebensraten in den Subgruppen

5.3. Ergebnisse der Blutgasanalysen

Die am Versuchsende entnommenen Blutproben wurden bezüglich des pO_2 , pCO_2 und dem pH-Wert in einer Blutgasanalyse aufbereitet. Zwischen den einzelnen Subgruppen bestand kein signifikanter Unterschied bezüglich der erhobenen Parameter. Der pO_2 in der SAB-Neutropeniegruppe betrug $144.7 \pm 11,9$ mmHg gegenüber $152 \pm 10,7$ mmHg in der SAB-Placebo Gruppe gegenüber $150.2 \pm 10,2$ mmHg in der Sham Gruppe. Der pCO_2 lag bei $46,7 \pm 1,5$ mmHg in der SAB-Neutropeniegruppe gegenüber $44,4, \pm 1,6$ mmHg in der SAB-Placebogruppe gegenüber $43,8 \pm 10$ mmHg in der Sham Gruppe. Der pH-Wert in der SAB-Neutropeniegruppe lag bei $7,3 \pm 0,01$ gegenüber $7,3 \pm 0,01$ in der SAB- Placebogruppe gegenüber $7,3 \pm 0,13$ in der Sham Gruppe. Das Gewicht vor der Operation lag bei $26,5 \pm 1,2$ g gegenüber $26,2 \pm 2,7$ g vor der Perfusion und Organentnahme, zwischen den Gruppen gab es keine deutlichen Unterschiede.

5.4. Störung der Blut-Hirn-Schranke in der Sham Gruppe

Ausgemessen wurde jeweils die Gesamtfläche (FI), die Fläche ohne erhöhte IgG-Immunofluoreszenz als Fläche ohne Schaden (FOS) sowie die Schadensfläche, definiert als das mikroskopisch nachweisbare Areal mit erhöhter IgG-Immunofluoreszenz. Je nach anatomischer Beschaffenheit des jeweiligen Versuchsobjektes wurden die Schnitte aus den Schnittebenen 7 (FI7) bis 11 (FI11) entnommen und ausgemessen. Darüber hinaus wurde der Mittelwert der Gesamtfläche, der Mittelwert der Fläche ohne Schaden, der Mittelwert der Schadensfläche, sowie die Schadensfläche in Prozent berechnet. Alle Ergebnisse finden sich nachfolgend geplottet in Graphen.

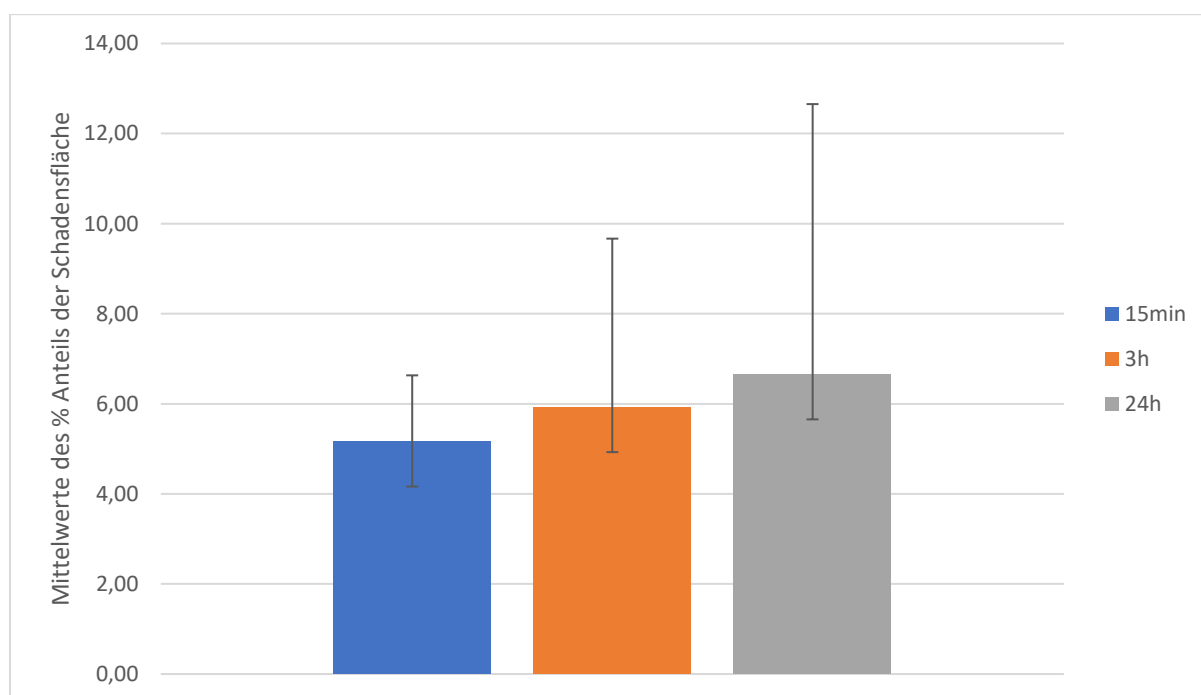


Abbildung 22 Anteil des schrankengestörten Areales an der Gesamtfläche in der Shamgruppe

Auf der Y- Achse abgebildet findet sich die Schadensfläche im prozentualen Verhältnis zu der jeweiligen Hirnhemisphäre. Auf der X- Achse sind die Mittelwerte der 3 Subgruppen nach 15min, 3h und 24h mit Standardabweichung gegenübergestellt.

5.5. Schadensfläche in der SAB- Control- Gruppe

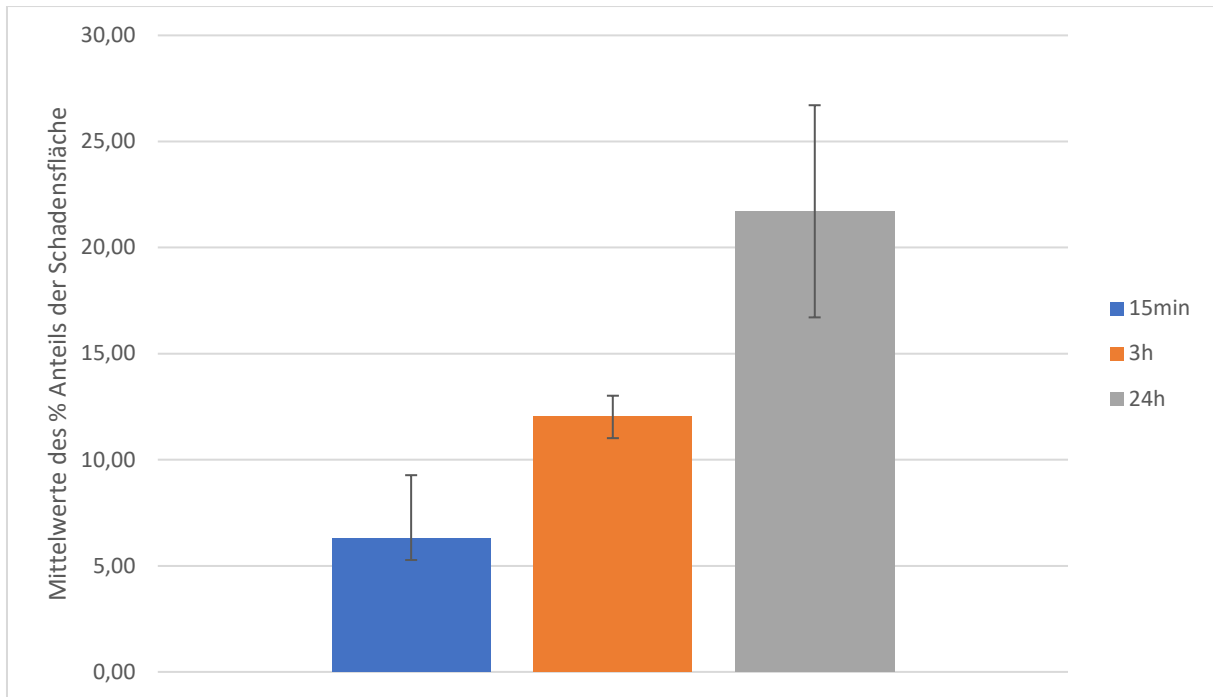


Abbildung 23 Anteil des schrankengestörten Areales an der Gesamtfläche in der SAB-Placebo Gruppe. Auf der Y- Achse abgebildet findet sich die Schadensfläche im prozentualen Verhältnis zu der jeweiligen Hirnhemisphäre. Auf der X- Achse sind die Mittelwerte der 3 Subgruppen nach 15min, 3h und 24h mit Standardabweichung gegenübergestellt.

5.6. Schadenfläche in der Depletierten- Gruppe

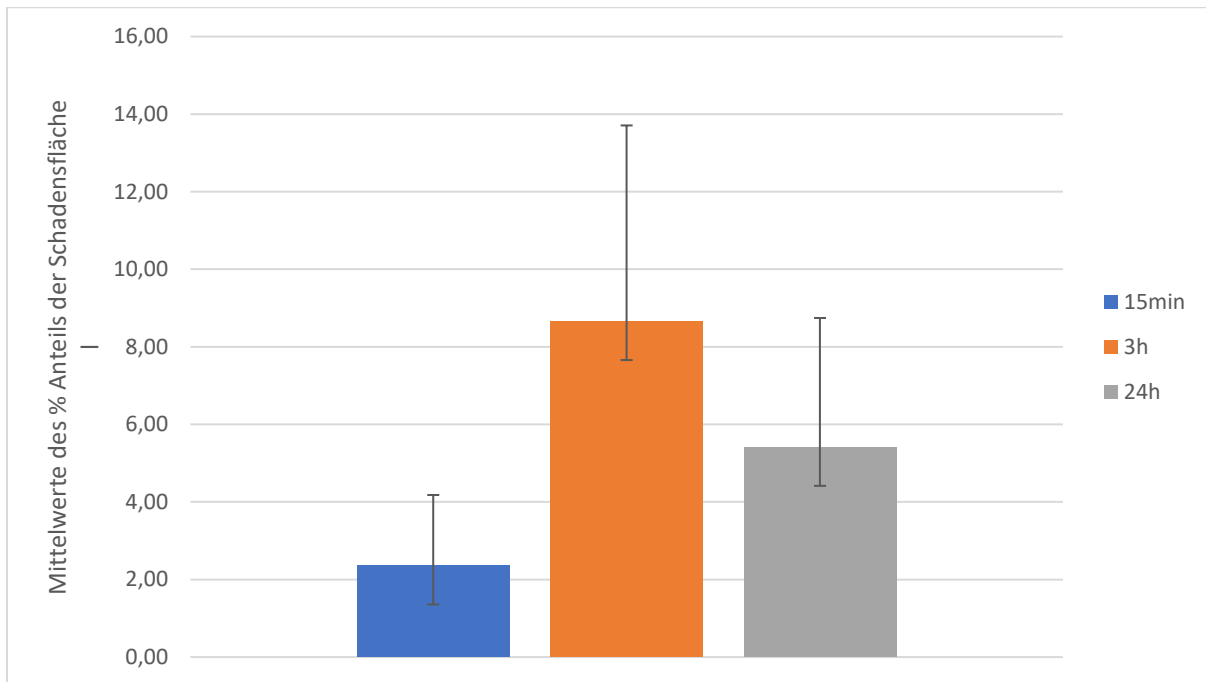


Abbildung 23 Anteil des schrankengestörten Areales an der Gesamtfläche in der SAB- Depletierten Gruppe.

Auf der Y- Achse abgebildet findet sich die Schadensfläche im prozentualen Verhältnis zu der jeweiligen Hirnhemisphäre. Auf der X- Achse sind die Mittelwerte der 3 Subgruppen nach 15min, 3h und 24h mit Standardabweichung gegenübergestellt.

5.7. Mittelwerte alle Flächen inklusive Standardabweichung

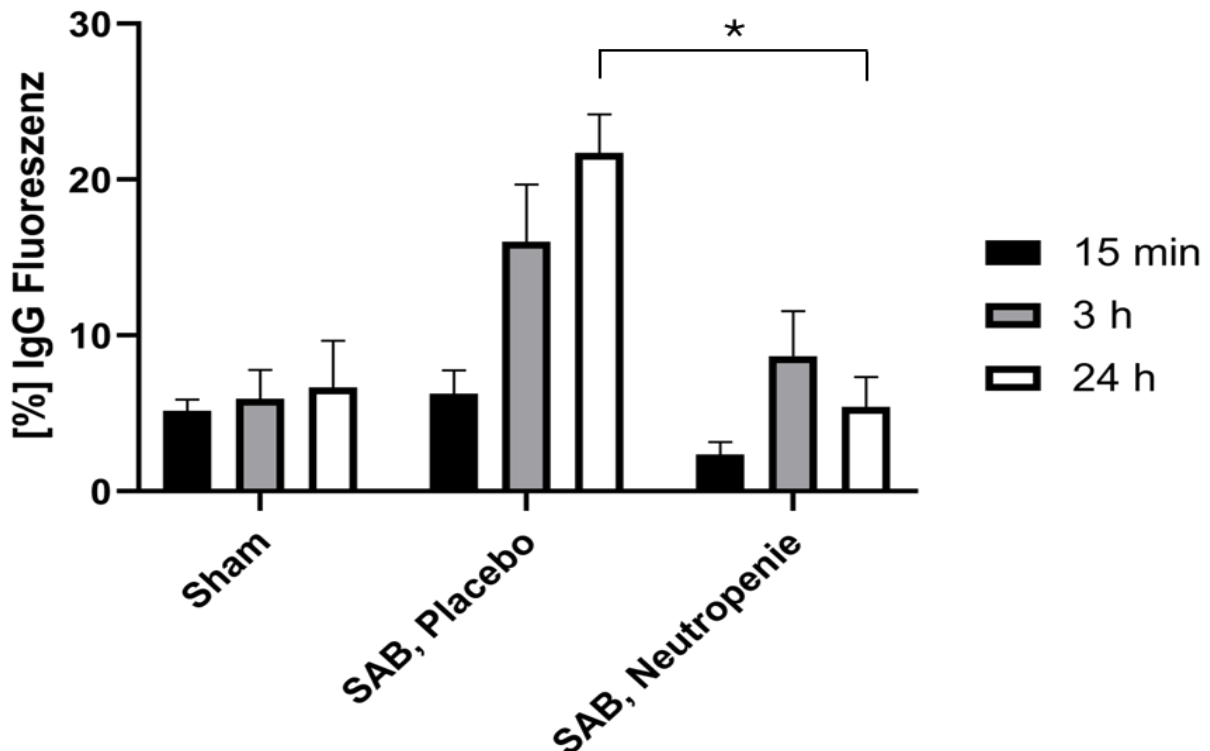


Abbildung 24 Mittelwerte aller Schadensflächen in allen Subgruppen mit Standardabweichung

Auf der Y- Achse abgebildet findet sich die Schadensfläche im prozentualen Verhältnis zu der jeweiligen Hirnhemisphäre. Auf der X- Achse abgebildet finden sich die Mittelwerte aller jeweiligen Subgruppen.

In der Shamgruppe kam es nicht zu einem deutlichen Anstieg der Schadensfläche, d. h. der Fläche mit erhöhter IgG Fluoreszenz, welche als Surrogatparameter für die Blut-Hirn-Schrankenstörung zu sehen ist. In der SAB-Placebogruppe kommt es nach Induktion der SAB zu einem signifikanten Anstieg der schrankengestörten Fläche. Anhand der Grafiken lässt sich erkennen, dass sich das Ausmaß der Schadensfläche durch die Depletion von Neutrophilen nahezu den Werten angleicht, welche in der Sham Gruppe erhoben wurden.

Zusammenfassend zeigen die Daten, dass die Induktion einer SAB zu einer Störung der Blut-Hirn-Schranke führt, was durch Induktion einer Neutropenie vor SAB-Induktion unterdrückt wird.

6. Diskussion

Bei der SAB handelt es sich um eine Form des hämorrhagischen Schlaganfalls, die in Mitteleuropa für etwa 5% aller Schlaganfälle verantwortlich ist. Die SAB hat daher eine hohe klinische Relevanz. Nach dem initialen Blutungsereignis führen verschiedene Mechanismen zu einer sekundären Hirnschädigung. Andere Studien haben gezeigt, dass es in experimentellen SAB-Modellen in Nagetieren Wochen nach der SAB zur Mikrogliaaktivierung mit konsekutivem neuronalen Zelluntergang kommt (Schneider et al., 2015). Andere Studien haben gezeigt, dass Neutrophile bereits Minuten nach einer SAB beginnen, in das Hämatom zu migrieren und oxidativen Stress zu verursachen (Neulen et al., 2019; Provencio et al., 2010). Weiterhin wurde gezeigt, dass durch Hemmung der Neutrophilenextravasation auch die Mikrogliaaktivierung im späteren Verlauf verringert wird (Friedrich et al., 2011; Provencio et al., 2016), was möglicherweise neuroprotektiv wirkt. Der Zusammenhang zwischen Neutrophilenextravasation und Mikrogliaaktivierung war jedoch unklar.

Vor dem Hintergrund der Meningitis und des SHT wurde gezeigt, dass Neutrophilenextravasation zu einer Störung der BHS führt, was wiederum zur Mikrogliaaktivierung führt (Santos-Lima, 2022; Jia, 2024). Sollten auch nach SAB die Neutrophilen für eine BHS verantwortlich sein, könnte dies den in anderen Studien aufgezeigten Zusammenhang zwischen Neutrophilenextravasation früh nach SAB und Mikrogliaaktivierung im späteren Verlauf erklären. Ziel dieser Dissertationsarbeit war es daher, die Frage zu untersuchen, ob neutrophile Granulozyten bedeutsam sind für die Ausbildung der Blut- Hirn- Schranken Störung nach einer SAB.

In der hier durchgeführten Studie konnte nachgewiesen werden, dass es im Mausmodell zu einer signifikant weniger ausgeprägten Blut- Hirn- Schranken- Störung kommt, wenn zuvor eine Neutropenie induziert wurde, indem neutrophile Granulozyten depletiert wurden. In der depletierten Gruppe kam es zu einer signifikant geringeren Ausprägung der IgG- Fluoreszenz. Nach Induktion einer SAB kam es zu einem deutlichen Anstieg der IgG- Fluoreszenz im Vergleich zur Sham- Gruppe, welche in der Neutrophilen-depletierten Gruppe signifikant geringer ausgeprägt war. Zusammenfassend zeigen diese Daten also, dass sich bei Versuchstieren mit depletierten Neutrophilen das Ausmaß der Blut- Hirn- Schranken- Störung nahezu der Sham- Gruppe annähert. Dies erscheint im Hintergrund der vorgenannten Studien plausibel, da es durch die Leukozyten- Endothel- Interaktion zur Extravasation von

Neutrophilen kommt und diese anschließenden u. a. oxidativen Stress vermitteln (Koedel et al., 1999; Li et al., 2022). Es ist plausibel, dass oxidativer Stress dann zur herabgesetzten Integrität der Blut-Hirn-Schranke führt (Chen, 2022; Fareed, 2022). Die Eingangsfragestellung kann dementsprechend mit der Aussage beantwortet werden, dass eine enge Assoziation zwischen neutrophilen Granulozyten und deren Extravasation und einer Blut- Hirn- Schranken- Störung besteht. Dies zeigt einen pathophysiologischen Mechanismus auf, der die zeitverzögert auftretende, von der Neutrophilenextravasation getriggerte Mikrogliaaktivierung erklären kann (Shi, 2023; Chen, 2023).

Diese Arbeit erbringt somit einen Beitrag zum pathophysiologischen Verständnis von sekundären Hirnschädigungen nach SAB.

7. Schlussfolgerung

Die bereits früh nach SAB einsetzende Extravasation von Neutrophilen scheint eine essenzielle Rolle für die Entwicklung einer Blut- Hirn- Schranken- Störung zu haben. Dies könnte ein zentraler pathophysiologischer Mechanismus für die sekundäre Hirnschädigung nach SAB sein, insbesondere der Aktivierung von Mikroglia und dem daraus resultierenden neuronalen Zelluntergang.

Im Hinblick auf die in dieser Arbeit erhobenen Daten scheint das Interaktionsverhalten von neutrophilen Granulozyten mit der neurovaskulären Einheit einen maßgeblichen Einfluss auf die Ausprägung einer Blut- Hirn- Schranken- Störung nach einer SAB zu haben. Dementsprechend könnte die Beeinflussung von neutrophilen Granulozyten genutzt werden, um das Ausmaß von sekundären Hirnschädigungen zu minimieren und dadurch das neurologische Outcome zu verbessern. Es bedarf jedoch weiterer Studien, um zu klären, ob die von den neutrophilen Granulozyten induzierte Blut- Hirn- Schranken- Störung das alleinige Phänomen ist, welches zur Aktivierung von zerebralen Inflammationsprozessen nach einer SAB führt.

8. Ausblick

Die in dieser Dissertation erarbeiteten Daten legen nahe, dass eine Enge Assoziation zwischen neutrophilen Granulozyten und der Desintegrität der Blut- Hirn- Schranke besteht. Dementsprechend bieten Neutrophile einen potenziellen Ansatzpunkt für neue Therapieansätze bei Patienten mit SAB. Jedoch ist weiterführende Forschung bezüglich der Übertragbarkeit vom Mausmodell auf den Menschen sowie für die klinische Anwendung nötig.

9. Literaturverzeichnis

Abruzzo, T., C. Moran, K. A. Blackham, C. J. Eskey, R. Lev, P. Meyers, S. Narayanan and C. J. Prestigiacomo (2012). "Invasive interventional management of post-hemorrhagic cerebral vasospasm in patients with aneurysmal subarachnoid hemorrhage." J Neurointerv Surg **4**(3): 169-177.

Aburto-Murrieta, Y., J. M. Marquez-Romero, D. Bonifacio-Delgadillo, I. López and B. Hernández-Curiel (2012). "Endovascular treatment: balloon angioplasty versus nimodipine intra-arterial for medically refractory cerebral vasospasm following aneurysmal subarachnoid hemorrhage." Vasc Endovascular Surg **46**(6): 460-465.

Albanna, W., M. Weiss, C. Conzen, H. Clusmann, T. Schneider, M. Reinsch, M. Müller, M. Wiesmann, A. Höllig and G. A. Schubert (2017). "Systemic and Cerebral Concentration of Nimodipine During Established and Experimental Vasospasm Treatment." World Neurosurg **102**: 459-465.

Anderson, G. B., R. Ashforth, D. E. Steinke and J. M. Findlay (2000). "CT angiography for the detection of cerebral vasospasm in patients with acute subarachnoid hemorrhage." AJNR Am J Neuroradiol **21**(6): 1011-1015.

Arias, E. J., S. Vajapey, M. R. Reynolds, M. R. Chicoine, K. M. Rich, R. G. Dacey, Jr., I. G. Dorward, C. P. Derdeyn, C. J. Moran, D. T. Cross, 3rd, G. J. Zipfel and R. Dhar (2015). "Utility of Screening for Cerebral Vasospasm Using Digital Subtraction Angiography." Stroke **46**(11): 3137-3141.

Atangana, E., U. C. Schneider, K. Blecharz, S. Magrini, J. Wagner, M. Nieminen-Kelhä, I. Kremenetskaia, F. L. Heppner, B. Engelhardt and P. Vajkoczy (2017). "Intravascular Inflammation Triggers Intracerebral Activated Microglia and Contributes to Secondary Brain Injury After Experimental Subarachnoid Hemorrhage (eSAH)." Transl Stroke Res **8**(2): 144-156.

Bakker, N. A., R. J. Groen, M. Foumani, M. Uyttenboogaart, O. S. Eshghi, J. D. Metzemaekers, N. Lammers, G. J. Luijckx and J. M. Van Dijk (2014). "Repeat digital subtraction angiography after a negative baseline assessment in nonperimesencephalic subarachnoid hemorrhage: a pooled data meta-analysis." J Neurosurg **120**(1): 99-103.

Bavbek, M., R. Polin, A. L. Kwan, A. S. Arthur, N. F. Kassell and K. S. Lee (1998). "Monoclonal antibodies against ICAM-1 and CD18 attenuate cerebral vasospasm after experimental subarachnoid hemorrhage in rabbits." Stroke **29**(9): 1930-1935; discussion 1935-1936.

Bhagal, P., P. A. Brouwer, K. Söderqvist Å, M. Ohlsson, T. Andersson, S. Holmin and M. Söderman (2015). "Patients with subarachnoid haemorrhage from vertebrobasilar dissection: treatment with stent-in-stent technique." Neuroradiology **57**(6): 605-614.

Binaghi, S., M. L. Colleoni, P. Maeder, A. Uské, L. Regli, A. R. Dehdashti, P. Schnyder and R. Meuli (2007). "CT angiography and perfusion CT in cerebral vasospasm after subarachnoid hemorrhage." AJNR Am J Neuroradiol **28**(4): 750-758.

Birk, S., C. Kruuse, K. A. Petersen, O. Jonassen, P. Tfelt-Hansen and J. Olesen (2004). "The phosphodiesterase 3 inhibitor cilostazol dilates large cerebral arteries in humans without affecting regional cerebral blood flow." J Cereb Blood Flow Metab **24**(12): 1352-1358.

Boes, M., M. Henning, H. Urbach and M. Simon (2011). "Delayed diagnosis of subarachnoid hemorrhage associated with Tako-tsubo cardiomyopathy." Cent Eur Neurosurg **72**(1): 49-51.

Bond, K. M., T. Krings, G. Lanzino and W. Brinjikji (2020). "Intracranial dissections: A pictorial review of pathophysiology, imaging features, and natural history." J Neuroradiol.

Budohoski, K. P., M. Guilfoyle, A. Helmy, T. Huuskonen, M. Czosnyka, R. Kirollos, D. K. Menon, J. D. Pickard and P. J. Kirkpatrick (2014). "The pathophysiology and treatment of delayed cerebral ischaemia following subarachnoid haemorrhage." J Neurol Neurosurg Psychiatry **85**(12): 1343-1353.

Bulsara, K. R., M. Günel, S. Amin-Hanjani, P. R. Chen, E. S. Connolly and R. M. Friedlander (2015). "Results of a national cerebrovascular neurosurgery survey on the management of cerebral vasospasm/delayed cerebral ischemia." J Neurointerv Surg **7**(6): 408-411.

Catapano, J. S., M. J. Lang, S. W. Koester, D. J. Wang, J. D. DiDomenico, V. L. Fredrickson, T. S. Cole, J. Lee, M. T. Lawton, A. F. Ducruet and F. C. Albuquerque (2020). "Digital subtraction cerebral angiography after negative computed tomography angiography findings in non-traumatic subarachnoid hemorrhage." J Neurointerv Surg **12**(5): 526-530.

Chaichana, K. L., G. Pradilla, J. Huang and R. J. Tamargo (2010). "Role of inflammation (leukocyte-endothelial cell interactions) in vasospasm after subarachnoid hemorrhage." World Neurosurg **73**(1): 22-41.

Chaudhary, S. R., N. Ko, W. P. Dillon, M. B. Yu, S. Liu, G. I. Criqui, R. T. Higashida, W. S. Smith and M. Wintermark (2008). "Prospective evaluation of multidetector-row CT angiography for the diagnosis of vasospasm following subarachnoid hemorrhage: a comparison with digital subtraction angiography." Cerebrovasc Dis **25**(1-2): 144-150.

Chen, S., J. Luo, C. Reis, A. Manaenko and J. Zhang (2017). "Hydrocephalus after Subarachnoid Hemorrhage: Pathophysiology, Diagnosis, and Treatment." Biomed Res Int **2017**: 8584753.

Cho, W. S., H. S. Kang, J. E. Kim, O. K. Kwon, C. W. Oh, Y. J. Son, B. J. Know, C. Jung and M. H. Hang (2011). "Intra-arterial nimodipine infusion for cerebral vasospasm in patients with aneurysmal subarachnoid hemorrhage." Interv Neuroradiol **17**(2): 169-178.

Connolly, E. S., Jr., A. A. Rabinstein, J. R. Carhuapoma, C. P. Derdeyn, J. Dion, R. T. Higashida, B. L. Hoh, C. J. Kirkness, A. M. Naidech, C. S. Ogilvy, A. B. Patel, B. G. Thompson and P. Vespa (2012). "Guidelines for the management of aneurysmal subarachnoid hemorrhage: a guideline for healthcare professionals from the American Heart Association/American Stroke Association." Stroke **43**(6): 1711-1737.

Connolly, E. S., A. A. Rabinstein, J. R. Carhuapoma, C. P. Derdeyn, J. Dion, R. T. Higashida, B. L. Hoh, C. J. Kirkness, A. M. Naidech, C. S. Ogilvy, A. B. Patel, B. G. Thompson and P. Vespa (2012). "Guidelines for the Management of Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage." Stroke **43**(6): 1711-1737.

de Oliveira Manoel, A. L. and R. L. Macdonald (2018). "Neuroinflammation as a Target for Intervention in Subarachnoid Hemorrhage." Front Neurol **9**: 292.

Di Russo, P., D. T. Di Carlo, A. Lutenberg, R. Morganti, A. I. Evins and P. Perrini (2020). "Shunt-dependent hydrocephalus after aneurysmal subarachnoid hemorrhage." J Neurosurg Sci **64**(2): 181-189.

Dinc, N., S. Y. Won, M. Eibach, J. Quick-Weller, J. Konczalla, J. Berkefeld, V. Seifert and G. Marquardt (2019). "Cerebral Vasospasm Due to Arteriovenous Malformation-Associated Hemorrhage: Impact of Bleeding Source and Pattern." Cerebrovasc Dis **47**(3-4): 165-170.

Djelilovic-Vranic, J., V. Basic-Kes, M. Tiric-Campara, E. Djozic and J. Kulenovic (2017). "Follow-up of Vasospasm by Transcranial Doppler Sonography (TCD) in Subarachnoid Hemorrhage (SAH)." Acta Inform Med **25**(1): 14-18.

Dorhout Mees, S. M., A. Algra, W. P. Vandertop, F. van Kooten, H. A. Kuijsten, J. Boiten, R. J. van Oostenbrugge, R. Al-Shahi Salman, P. M. Lavados, G. J. Rinkel and W. M. van den Bergh (2012). "Magnesium for aneurysmal subarachnoid haemorrhage (MASH-2): a randomised placebo-controlled trial." Lancet **380**(9836): 44-49.

Dorsch, N. (2011). "A clinical review of cerebral vasospasm and delayed ischaemia following aneurysm rupture." Acta Neurochir Suppl **110**(Pt 1): 5-6.

Dreier, J. P., C. Drenckhahn, J. Woitzik, S. Major, N. Offenhauser, S. Weber-Carstens, S. Wolf, A. J. Strong, P. Vajkoczy and J. A. Hartings (2013). "Spreading ischemia after aneurysmal subarachnoid hemorrhage." Acta Neurochir Suppl **115**: 125-129.

Elliott, J. P., D. W. Newell, D. J. Lam, J. M. Eskridge, C. M. Douville, P. D. Le Roux, D. H. Lewis, M. R. Mayberg, M. S. Grady and H. R. Winn (1998). "Comparison of balloon angioplasty and papaverine infusion for the treatment of vasospasm following aneurysmal subarachnoid hemorrhage." J Neurosurg **88**(2): 277-284.

Etminan, N., H. S. Chang, K. Hackenberg, N. K. de Rooij, M. D. I. Vergouwen, G. J. E. Rinkel and A. Algra (2019). "Worldwide Incidence of Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage According to Region, Time Period, Blood Pressure, and Smoking Prevalence in the Population: A Systematic Review and Meta-analysis." JAMA Neurol **76**(5): 588-597.

Foreman, B. (2016). "The Pathophysiology of Delayed Cerebral Ischemia." J Clin Neurophysiol **33**(3): 174-182.

Francoeur, C. L. and S. A. Mayer (2016). "Management of delayed cerebral ischemia after subarachnoid hemorrhage." Crit Care **20**(1): 277.

Friedrich, V., R. Flores, A. Muller, W. Bi, E. I. Peerschke and F. A. Sehba (2011). "Reduction of neutrophil activity decreases early microvascular injury after subarachnoid haemorrhage." J Neuroinflammation **8**: 103.

Fu, F. W., J. Rao, Y. Y. Zheng, L. Song, W. Chen, Q. H. Zhou, J. G. Yang, J. Q. Ke and G. Q. Zheng (2017). "Perimesencephalic nonaneurysmal subarachnoid hemorrhage caused by transverse sinus thrombosis: A case report and review of literature." Medicine (Baltimore) **96**(33): e7374.

Greenberg, E. D., R. Gold, M. Reichman, M. John, J. Ivanidze, A. M. Edwards, C. E. Johnson, J. P. Comunale and P. Sanelli (2010). "Diagnostic accuracy of CT angiography and CT perfusion for cerebral vasospasm: a meta-analysis." AJNR Am J Neuroradiol **31**(10): 1853-1860.

Greter, M., I. Lelios and A. L. Croxford (2015). "Microglia Versus Myeloid Cell Nomenclature during Brain Inflammation." Front Immunol **6**: 249.

Gris, T., P. Laplante, P. Thebault, R. Cayrol, A. Najjar, B. Joannette-Pilon, F. Brillant-Marquis, E. Magro, S. W. English, R. Lapointe, M. Bojanowski, C. L. Francoeur and J. F. Cailhier (2019). "Innate immunity activation in the early brain injury period following subarachnoid hemorrhage." J Neuroinflammation **16**(1): 253.

Gross, B. A., N. Lin, K. U. Frerichs and R. Du (2012). "Vasospasm after spontaneous angiographically negative subarachnoid hemorrhage." Acta Neurochir (Wien) **154**(7): 1127-1133.

Harrod, C. G., B. R. Bendok and H. H. Batjer (2005). "Prediction of cerebral vasospasm in patients presenting with aneurysmal subarachnoid hemorrhage: a review." Neurosurgery **56**(4): 633-654; discussion 633-654.

Harroud, A. and A. Z. Crepeau (2017). "Epilepsy and mortality after aneurysmal subarachnoid hemorrhage." Neurology **89**(3): 222-223.

Hijdra, A., J. Van Gijn, S. Stefanko, K. J. Van Dongen, M. Vermeulen and H. Van Crevel (1986). "Delayed cerebral ischemia after aneurysmal subarachnoid hemorrhage: clinicoanatomic correlations." Neurology **36**(3): 329-333.

Hoh, B. L. and C. S. Ogilvy (2005). "Endovascular treatment of cerebral vasospasm: transluminal balloon angioplasty, intra-arterial papaverine, and intra-arterial nicardipine." Neurosurg Clin N Am **16**(3): 501-516, vi.

Honda, M., S. Sase, K. Yokota, R. Ichibayashi, K. Yoshihara, Y. Sakata, H. Masuda, H. Uekusa, Y. Seiki and T. Kishi (2012). "Early cerebral circulatory disturbance in patients suffering subarachnoid hemorrhage prior to the delayed cerebral vasospasm stage: xenon computed tomography and perfusion computed tomography study." Neurol Med Chir (Tokyo) **52**(7): 488-494.

Huang, J. and J. M. van Gelder (2002). "The probability of sudden death from rupture of intracranial aneurysms: a meta-analysis." Neurosurgery **51**(5): 1101-1105; discussion 1105-1107.

Huenges Wajer, I. M. C., S. M. Dorhout Mees, W. M. van den Bergh, A. Algra, J. M. A. Visser-Meily, G. J. E. Rinkel and M. J. E. van Zandvoort (2018). "Effect of magnesium on cognition after aneurysmal subarachnoid haemorrhage in a randomized trial." Eur J Neurol **25**(12): 1486-1489.

Jabbarli, R., D. Pierscianek, R. Rölz, M. Darkwah Oppong, K. Kaier, M. Shah, C. Taschner, C. Mönninghoff, H. Urbach, J. Beck, U. Sure and M. Forsting (2019). "Endovascular treatment of cerebral vasospasm after subarachnoid hemorrhage: More is more." Neurology **93**(5): e458-e466.

Kamp, M. A., H. J. Heiroth, K. Beseoglu, B. Turowski, H. J. Steiger and D. Hänggi (2012). "Early CT perfusion measurement after aneurysmal subarachnoid hemorrhage: a screening method to predict outcome?" Acta Neurochir Suppl **114**: 329-332.

Khey, K. M. W., A. Huard and S. H. Mahmoud (2020). "Inflammatory Pathways Following Subarachnoid Hemorrhage." Cell Mol Neurobiol **40**(5): 675-693.

Kitamura, Y., M. Nomura, H. Shima, N. Kuwana, T. Kuramitsu, C. C. Chang, K. Bando, I. Shibata and H. Nishikawa (2010). "Acute lung injury associated with systemic inflammatory response syndrome following subarachnoid hemorrhage: a survey by the Shonan Neurosurgical Association." Neurol Med Chir (Tokyo) **50**(6): 456-460.

Kolaczowska, E. and P. Kubes (2013). "Neutrophil recruitment and function in health and inflammation." Nat Rev Immunol **13**(3): 159-175.

Kruger, P., M. Saffarzadeh, A. N. Weber, N. Rieber, M. Radsak, H. von Bernuth, C. Benarafa, D. Roos, J. Skokowa and D. Hartl (2015). "Neutrophils: Between host defence, immune modulation, and tissue injury." PLoS Pathog **11**(3): e1004651.

Li, R., Q. Yuan, Y. Su, M. Chopp, T. Yan and J. Chen (2020). "Immune response mediates the cardiac damage after subarachnoid hemorrhage." Exp Neurol **323**: 113093.

Long, B., A. Koyfman and M. S. Runyon (2017). "Subarachnoid Hemorrhage: Updates in Diagnosis and Management." Emerg Med Clin North Am **35**(4): 803-824.

Lucke-Wold, B. P., A. F. Logsdon, B. Manoranjan, R. C. Turner, E. McConnell, G. E. Vates, J. D. Huber, C. L. Rosen and J. M. Simard (2016). "Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage and Neuroinflammation: A Comprehensive Review." Int J Mol Sci **17**(4): 497.

Macdonald, R. L. (2014). "Delayed neurological deterioration after subarachnoid haemorrhage." Nat Rev Neurol **10**(1): 44-58.

Macdonald, R. L., D. Hänggi, P. Strange, H. J. Steiger, J. Mocco, M. Miller, S. A. Mayer, B. L. Hoh, H. J. Faleck, N. Etminan, M. N. Diringer, A. P. Carlson and F. Aldrich (2019). "Nimodipine pharmacokinetics after intraventricular injection of sustained-release nimodipine for subarachnoid hemorrhage." J Neurosurg: 1-7.

Macdonald, R. L., R. T. Higashida, E. Keller, S. A. Mayer, A. Molyneux, A. Raabe, P. Vajkoczy, I. Wanke, D. Bach, A. Frey, P. Nowbakht, S. Roux and N. Kassell (2012). "Randomized trial of clazosentan in patients with aneurysmal subarachnoid hemorrhage undergoing endovascular coiling." Stroke **43**(6): 1463-1469.

Macdonald, R. L. and T. A. Schweizer (2017). "Spontaneous subarachnoid haemorrhage." Lancet **389**(10069): 655-666.

Macdonald, R. L. and B. K. Weir (1991). "A review of hemoglobin and the pathogenesis of cerebral vasospasm." Stroke **22**(8): 971-982.

Mazurek, M., K. Krzystolik, E. Lachowicz, K. Kubasik-Kladna and D. Czepita (2014). "[Terson syndrome-a literature review]." Klin Oczna **116**(1): 59-63.

Michalak, Z., A. Lebrun, M. D. Miceli, M.-C. Rousset, A. Crespel, P. Coubes, D. C. Henshall, M. Lerner-Natoli and V. Rigau (2012). "IgG Leakage May Contribute to Neuronal Dysfunction in Drug-Refractory Epilepsies With Blood-Brain Barrier Disruption." Journal of Neuropathology & Experimental Neurology **71**(9): 826-838.

Muehlschlegel, S. (2018). "Subarachnoid Hemorrhage." Continuum (Minneapolis) **24**(6): 1623-1657.

Mustari, A., N. Nakamura, S. Kawauchi, S. Sato, M. Sato and I. Nishidate (2018). "RGB camera-based imaging of cerebral tissue oxygen saturation, hemoglobin concentration, and hemodynamic spontaneous low-frequency oscillations in rat brain following induction of cortical spreading depression." Biomedical Optics Express **9**.

Neulen, A., S. Meyer, A. Kramer, T. Pantel, M. Kosterhon, S. Kunzelmann, H. Goetz and S. C. Thal (2018). "Large Vessel Vasospasm Is Not Associated with Cerebral Cortical Hypoperfusion in a Murine Model of Subarachnoid Hemorrhage." Transl Stroke Res **10**(3): 319-326.

Neulen, A., T. Pantel, A. Dieter, M. Kosterhon, M. Berres, S. C. Thal, M. A. Brockmann and S. R. Kantelhardt (2019). "Volumetric analysis of intracranial vessels: a novel tool for evaluation of cerebral vasospasm." Int J Comput Assist Radiol Surg **14**(1): 157-167.

Neulen, A., T. Pantel, M. Kosterhon, A. Kramer, S. Kunath, M. Petermeyer, B. Moosmann, J. Lotz, S. R. Kantelhardt, F. Ringel and S. C. Thal (2019). "Neutrophils mediate early cerebral cortical hypoperfusion in a murine model of subarachnoid haemorrhage." Sci Rep **9**(1): 8460.

- Osteraas, N. D. and V. H. Lee (2017). "Neurocardiology." Handb Clin Neurol **140**: 49-65.
- Paisan, G. M., D. Ding, R. M. Starke, R. W. Crowley and K. C. Liu (2018). "Shunt-Dependent Hydrocephalus After Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage: Predictors and Long-Term Functional Outcomes." Neurosurgery **83**(3): 393-402.
- Petridis, A. K., M. A. Kamp, J. F. Cornelius, T. Beez, K. Beseoglu, B. Turowski and H. J. Steiger (2017). "Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage." Dtsch Arztebl Int **114**(13): 226-236.
- Pickard, J. D., G. D. Murray, R. Illingworth, M. D. Shaw, G. M. Teasdale, P. M. Foy, P. R. Humphrey, D. A. Lang, R. Nelson, P. Richards and et al. (1989). "Effect of oral nimodipine on cerebral infarction and outcome after subarachnoid haemorrhage: British aneurysm nimodipine trial." Bmj **298**(6674): 636-642.
- Provencio, J. J. (2013). "Inflammation in subarachnoid hemorrhage and delayed deterioration associated with vasospasm: a review." Acta Neurochir Suppl **115**: 233-238.
- Provencio, J. J., T. Altay, S. Smithason, S. K. Moore and R. M. Ransohoff (2011). "Depletion of Ly6G/C(+) cells ameliorates delayed cerebral vasospasm in subarachnoid hemorrhage." J Neuroimmunol **232**(1-2): 94-100.
- Provencio, J. J., X. Fu, A. Siu, P. A. Rasmussen, S. L. Hazen and R. M. Ransohoff (2010). "CSF neutrophils are implicated in the development of vasospasm in subarachnoid hemorrhage." Neurocrit Care **12**(2): 244-251.
- Rinkel, G. J., M. Djibuti, A. Algra and J. van Gijn (1998). "Prevalence and risk of rupture of intracranial aneurysms: a systematic review." Stroke **29**(1): 251-256.
- Rinkel, G. J. E. (2019). "Management of patients with unruptured intracranial aneurysms." Curr Opin Neurol **32**(1): 49-53.
- Sacco, S., R. Totaro, D. Toni, C. Marini, D. Cerone and A. Carolei (2009). "Incidence, case-fatality and 10-year survival of subarachnoid hemorrhage in a population-based registry." Eur Neurol **62**(3): 155-160.
- Sandow, N., D. Diesing, A. Sarrafzadeh, P. Vajkoczy and S. Wolf (2016). "Nimodipine Dose Reductions in the Treatment of Patients with Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage." Neurocrit Care **25**(1): 29-39.
- Scherer, M., J. O. Jung, J. Cordes, L. Wessels, A. Younsi, S. Schönenberger, M. A. Möhlenbruch, K. Maier-Hein, A. Unterberg and K. Zweckberger (2020). "Association of Cerebrospinal Fluid Volume with Cerebral Vasospasm After Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage: A Retrospective Volumetric Analysis." Neurocrit Care **33**(1): 152-164.
- Schubert, G. A., M. Seiz, A. A. Hegewald, J. Manville and C. Thomé (2009). "Acute hypoperfusion immediately after subarachnoid hemorrhage: a xenon contrast-enhanced CT study." J Neurotrauma **26**(12): 2225-2231.
- Schubert, G. A., M. Seiz, A. A. Hegewald, J. Manville and C. Thomé (2011). "Hypoperfusion in the acute phase of subarachnoid hemorrhage." Acta Neurochir Suppl **110**(Pt 1): 35-38.
- Smith, W. S., C. F. Dowd, S. C. Johnston, N. U. Ko, S. J. DeArmond, W. P. Dillon, D. Setty, M. T. Lawton, W. L. Young, R. T. Higashida and V. V. Halbach (2004). "Neurotoxicity of intra-arterial papaverine

preserved with chlorobutanol used for the treatment of cerebral vasospasm after aneurysmal subarachnoid hemorrhage." Stroke **35**(11): 2518-2522.

Steiner, T., S. Juvela, A. Unterberg, C. Jung, M. Forsting and G. Rinkel (2013). "European Stroke Organization guidelines for the management of intracranial aneurysms and subarachnoid haemorrhage." Cerebrovasc Dis **35**(2): 93-112.

Strong, A. J. and R. L. Macdonald (2012). "Cortical spreading ischemia in the absence of proximal vasospasm after aneurysmal subarachnoid hemorrhage: evidence for a dual mechanism of delayed cerebral ischemia." J Cereb Blood Flow Metab **32**(2): 201-202.

Suarez, J. I. (2015). "Diagnosis and Management of Subarachnoid Hemorrhage." Continuum (Minneapolis) **21**(5 Neurocritical Care): 1263-1287.

Thompson, B. G., R. D. Brown, Jr., S. Amin-Hanjani, J. P. Broderick, K. M. Cockcroft, E. S. Connolly, Jr., G. R. Duckwiler, C. C. Harris, V. J. Howard, S. C. Johnston, P. M. Meyers, A. Molyneux, C. S. Ogilvy, A. J. Ringer and J. Torner (2015). "Guidelines for the Management of Patients With Unruptured Intracranial Aneurysms: A Guideline for Healthcare Professionals From the American Heart Association/American Stroke Association." Stroke **46**(8): 2368-2400.

Toi, H., N. Matsumoto, K. Yokosuka, S. Matsubara, K. Hirano and M. Uno (2013). "Prediction of cerebral vasospasm using early stage transcranial Doppler." Neurol Med Chir (Tokyo) **53**(6): 396-402.

Tseng, M. Y. (2011). "Summary of evidence on immediate statins therapy following aneurysmal subarachnoid hemorrhage." Neurocrit Care **15**(2): 298-301.

Tumani, H., A. Petzold, M. Wick, H. J. Kühn, M. Uhr, M. Otto, A. Regeniter and J. Brettschneider (2010). "Liquordiagnostik bei CT-negativer Subarachnoidalblutung." Der Nervenarzt **81**(8): 973-979.

Üllen, A., E. Singewald, V. Konya, G. Fauler, H. Reicher, C. Nussold, A. Hammer, D. Kratky, A. Heinemann, P. Holzer, E. Malle and W. Sattler (2013). "Myeloperoxidase-derived oxidants induce blood-brain barrier dysfunction in vitro and in vivo." PLoS One **8**(5): e64034.

van Gijn, J., R. S. Kerr and G. J. Rinkel (2007). "Subarachnoid haemorrhage." Lancet **369**(9558): 306-318.

van Lieshout, J. H., M. Dibué-Adjei, J. F. Cornelius, P. J. Slotty, T. Schneider, T. Restin, H. D. Boogaarts, H. J. Steiger, A. K. Petridis and M. A. Kamp (2018). "An introduction to the pathophysiology of aneurysmal subarachnoid hemorrhage." Neurosurg Rev **41**(4): 917-930.

Vergouwen, M. D., R. J. de Haan, M. Vermeulen and Y. B. Roos (2010). "Effect of statin treatment on vasospasm, delayed cerebral ischemia, and functional outcome in patients with aneurysmal subarachnoid hemorrhage: a systematic review and meta-analysis update." Stroke **41**(1): e47-52.

Vergouwen, M. D., J. C. Meijers, R. B. Geskus, B. A. Coert, J. Horn, E. S. Stroes, T. van der Poll, M. Vermeulen and Y. B. Roos (2009). "Biologic effects of simvastatin in patients with aneurysmal subarachnoid hemorrhage: a double-blind, placebo-controlled randomized trial." J Cereb Blood Flow Metab **29**(8): 1444-1453.

Vergouwen, M. D., M. Vermeulen, B. A. Coert, E. S. Stroes and Y. B. Roos (2008). "Microthrombosis after aneurysmal subarachnoid hemorrhage: an additional explanation for delayed cerebral ischemia." J Cereb Blood Flow Metab **28**(11): 1761-1770.

Vergouwen, M. D., M. Vermeulen, J. van Gijn, G. J. Rinkel, E. F. Wijdicks, J. P. Muizelaar, A. D. Mendelow, S. Juvela, H. Yonas, K. G. Terbrugge, R. L. Macdonald, M. N. Diringer, J. P. Broderick, J. P. Dreier and Y. B. Roos (2010). "Definition of delayed cerebral ischemia after aneurysmal subarachnoid hemorrhage as an outcome event in clinical trials and observational studies: proposal of a multidisciplinary research group." Stroke **41**(10): 2391-2395.

Viderman, D., A. Sarria-Santamera and F. Bilotta (2021). "Side effects of continuous intra-arterial infusion of nimodipine in management of delayed cerebral ischemia in subarachnoid hemorrhage patients: A systematic review." Neurochirurgie.

Westermaier, T., A. Jauss, J. Eriskat, E. Kunze and K. Roosen (2009). "Time-course of cerebral perfusion and tissue oxygenation in the first 6 h after experimental subarachnoid hemorrhage in rats." J Cereb Blood Flow Metab **29**(4): 771-779.

Wijdicks, E. F., K. J. Vandongen, J. Vangijn, A. Hijdra and M. Vermeulen (1988). "Enlargement of the third ventricle and hyponatraemia in aneurysmal subarachnoid haemorrhage." J Neurol Neurosurg Psychiatry **51**(4): 516-520.

Wu, J., Y. Cai, X. Wu, Y. Ying, Y. Tai and M. He (2021). "Transcardiac Perfusion of the Mouse for Brain Tissue Dissection and Fixation." Bio Protoc **11**(5): e3988.

Yang, X. M., X. H. Chen, J. F. Lu, C. M. Zhou, J. Y. Han and C. H. Chen (2018). "In vivo observation of cerebral microcirculation after experimental subarachnoid hemorrhage in mice." Neural Regen Res **13**(3): 456-462.

Zhang, H., B. Zhang, S. Li, C. Liang, K. Xu and S. Li (2013). "Whole brain CT perfusion combined with CT angiography in patients with subarachnoid hemorrhage and cerebral vasospasm." Clin Neurol Neurosurg **115**(12): 2496-2501.

Zhong, W., Z. Zhang, P. Zhao, J. Shen, X. Li, D. Wang, G. Li and W. Su (2017). "The Impact of Initial Systemic Inflammatory Response After Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage." Turk Neurosurg **27**(3): 346-352.

10. Anhang/ Publikationsverzeichnis

10.1. Neutrophils induce a blood brain barrier disruption in a murine model of subarachnoid hemorrhage (Jahreskongress der deutschen Gesellschaft für Neurochirurgie 2021 in Erfurt)

Objective

Accumulated evidence suggests that neutrophil-triggered inflammation *early* after subarachnoid hemorrhage (SAH) activates cerebral inflammation with microglia activation and neuronal cell loss in the weeks after the hemorrhage. However, the mechanisms by which neutrophils activate cerebral inflammation after SAH remain unclear. In the pathophysiology of other diseases, a neutrophil-induced disruption of the blood-brain barrier (BBB) was shown to play a major role. We therefore examined the effect of neutrophils on the BBB in the first 24 hours after SAH in a murine endovascular filament perforation model of SAH.

Methods

SAH was induced in C57BL/6N mice by endovascular filament perforation. Neutropenia was induced by anti-Ly6G antibody injection 12 h prior to surgery, successful induction of neutropenia was verified by differential leukocyte counts at the end of the experiment. Animals were sacrificed at 15 min, 3 h, and 24 h after SAH. The brains were dissected and frozen in powdered dry ice, cryosections were obtained, and IgG fluorescence staining was performed. Positive IgG fluorescence was taken as a surrogate parameter for BBB disruption. The area with BBB disruption was determined for the left hemisphere. Data are expressed in percent relative to the ipsilateral hemisphere. The Mann-Whitney U test was used for statistical analysis with $p < 0.05$ considered as statistically significant.

Results

51 animals were assigned to either sham surgery or SAH induction with or without prior induction of neutropenia. SAH induction without prior induction of neutropenia induced a sharp increase in the area with BBB disruption (SAH, 15 min: $6,27 \pm 3,35\%$, 3 h: $16,02 \pm 6,35\%$, 24 h: $21,71 \pm 5,58\%$), which was not present after sham surgery (sham, 15 min: $5,16 \pm 1,64\%$, 3 h: $5,93 \pm 4,18\%$, 24 h: $6,65 \pm 6,71\%$). After induction of neutropenia, SAH-induced disruption of the BBB was attenuated compared to SAH

alone (SAH and neutropenia, 15 min: $2,36 \pm 2\%$, 3 h: $8,66 \pm 5,83\%$, 24 h: $5,42 \pm 3,84\%$), which reached statistical significance at 24 h post-SAH.

Conclusion

Already in the first hours after SAH, neutrophils induce a disruption of the BBB. Targeting neutrophil function or neutrophil interaction with the neurovascular unit could therefore be a promising strategy to mitigate BBB disruption after SAH. More studies are needed to examine whether the early neutrophil-induced BBB disruption is the critical phenomenon that leads to activation of cerebral inflammation in the weeks after SAH.

10.2 Neutrophils induce a blood brain barrier disruption in a murine model of subarachnoidal hemorrhage (Jahreskongress der European Association of Neurosurgery)

INTRODUCTION AND OBJECTIVE

Accumulated evidence suggests that neutrophil-triggered inflammation early after subarachnoid hemorrhage (SAH) activates cerebral inflammation with microglia activation and neuronal cell loss in the weeks after the hemorrhage. However, the detailed mechanisms remain unclear. Neutrophil-induced disruption of the blood brain barrier (BBB) was shown to play a major role in the pathophysiology of other diseases. We therefore examined the effect of neutrophils on the disruption of the blood brain barrier within the first 24h after experimental induction of SAH in mice using an endovascular filament perforation model.

Methods

SAH was induced in C57BL/6N mice by endovascular filament perforation. Successful induction of SAH was verified by monitoring the intracranial pressure (ICP) via a pressure probe that was implanted in the right hemisphere prior to surgery. Neutropenia was induced by intraperitoneal injection of anti- Ly6G antibody 12h prior to surgery. The control group received sodium-chloride as a placebo. Successful induction of neutropenia was verified by differential leukocyte counts from blood samples taken at the end of the experiment. The third subgroup underwent sham surgery.

The animals were sacrificed 15 min, 3h, or 24h after surgery. The brains were carefully removed and shock-frozen in powdered dry ice. For histological analysis we obtained multiple cryosections of each sample and performed an IgG immunofluorescence staining. Positive IgG fluorescence was taken as a surrogate parameter for BBB disruption (BBBD). The area with positive IgG-fluorescence was determined for the left hemisphere and the data expressed in percent relative to the ipsilateral hemisphere. For statistical analysis we used the Mann-Whitney U test with $p < 0.05$ considered as statistically significant.

Results

SAH induction markedly increased the area with BBB disruption (SAH, 15min: $6.3\pm 3.4\%$, 3h: $16.0\pm 6.4\%$, 24h: $21.7\pm 5.6\%$), which was not present after sham surgery (sham, 15min: $5.2\pm 1.6\%$, 3h: $5.9\pm 4.2\%$, 24h: $6.7\pm 6.7\%$). After induction of neutropenia, SAH-induced disruption of the BBB was attenuated compared to SAH alone (SAH and neutropenia, 15min: $2.4\pm 2.0\%$, 3 h: $8.7\pm 5.8\%$, 24 h: $5.4\pm 3.8\%$), reaching statistical significance (Mann-Whitney U test) at 24h post-SAH.

Conclusions

Already in the first hours after SAH, neutrophils induce a disruption of the BBB. Targeting neutrophil function or neutrophil interaction with the neurovascular unit could therefore be a promising strategy to mitigate BBB disruption after SAH. More studies are needed to examine whether the early neutrophil-induced BBB disruption is the critical phenomenon leading to activation of cerebral inflammation in the weeks after SAH.

10.3. Neutrophils mediate early cerebral cortical hypoperfusion in a murine model of subarachnoid haemorrhage (Nature Scientific report)

Abstract

Cerebral hypoperfusion in the first hours after subarachnoid haemorrhage (SAH) is a major determinant of poor neurological outcome. However, the underlying pathophysiology is only partly understood. Here we induced neutropenia in C57BL/6N mice by anti-Ly6G antibody injection, induced SAH by endovascular filament perforation, and analysed cerebral cortical perfusion with laser SPECKLE contrast imaging to investigate the role of neutrophils in mediating cerebral hypoperfusion during the first 24 h post-SAH. SAH induction significantly increased the intracranial pressure (ICP), and significantly reduced the cerebral perfusion pressure (CPP). At 3 h after SAH, ICP had returned to baseline and CPP was similar between SAH and sham mice. However, in SAH mice with normal neutrophil counts cortical hypoperfusion persisted. Conversely, despite similar CPP, cortical perfusion was significantly higher at 3 h after SAH in mice with neutropenia. The levels of 8-iso-prostaglandin-F₂α in the subarachnoid haematoma increased significantly at 3 h after SAH in animals with normal neutrophil counts indicating oxidative stress, which was not the case in neutropenic SAH animals. These results suggest that neutrophils are important mediators of cortical hypoperfusion and oxidative stress early after SAH. Targeting neutrophil function and neutrophil-induced oxidative stress could be a promising new approach to mitigate cerebral hypoperfusion early after SAH.

11. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen Menschen, die in jedweder Art und Weise an dieser Doktorarbeit beteiligt gewesen sind bedanken.

Mein besonderer Dank gilt hierbei meinem Betreuer, welcher mich während der gesamten Zeit ausgezeichnet betreut hat.

Für einen adäquaten Ausgleich gesorgt haben nicht nur meine Mainzer und Marburger Freunde, sondern auch meine Lebensgefährtin Lisa bei welchen ich mich hiermit für die Geduld, den Zuspruch und den alltäglichen Ausgleich bedanken möchte.

Meinen Eltern und meiner Familie möchte ich für den stetigen Zuspruch und die Ermöglichung des Studiums und damit auch dieser Dissertation danken.

Widmen möchte ich diese Doktorarbeit meinem Bruder Julius

12. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Maximilian Petermeyer
Geburtsdaten: 01.12.1992 in Aachen
Familienstand: verheiratet

Akademischer Werdegang

- 2013- 2015 Studium B.Sc. Biochemie an der Goethe Universität Frankfurt (bis zum 3. Fachsemester)
- 2015- 2017 Studium der Humanmedizin an der Riga Stradins Universität, Lettland
- 2017- 2018 Studium der Humanmedizin an der TU Dresden

Abschluss: 1. Staatsexamen

- 2018- 2021 Studium der Humanmedizin an der JGU Mainz

Abschluss: 2. Staatsexamen

- 2021-2022 Praktisches Jahr am GPR Krankenhaus Rüsselsheim

Abschluss: 3. Staatsexamen

- 2023- jetzt Assistenzarzt Unfallchirurgie und Orthopädie HELIOS Dr. Horst Schmidt Kliniken Wiesbaden

Publikationen und Dissertation

- Publikation im „nature research journal“ zum Thema „Neutrophils mediate early cerebral cortical hypoperfusion in a murine model of subarachnoid haemorrhage“

- Vorträge bei der „European Association of Neurosurgical Societies“ sowie der „Deutschen Gesellschaft für Neurochirurgie“
- Dissertationsarbeit in der Klinik für Neurochirurgie Mainz in interdisziplinärer Assoziation mit der Klinik für Anästhesiologie Mainz zum Erlangen des medizinischen Dokortitels