

Aus der Neurochirurgischen Klinik und
Poliklinik der Ludwig-Maximilians-Universität
München

Direktor: Prof. Dr. med. J.C. Tonn

und dem

Institut für Chirurgische Forschung im Walter-
Brendel-Zentrum für experimentelle Medizin

der

Ludwig-Maximilians-Universität München

Vorstand: Prof. Dr. med. U. Pohl

Veränderungen der zerebralen Mikrozirkulation nach experimenteller Subarachnoidalblutung bei der Maus

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Benjamin Friedrich

aus

Capri

2010

Mit Genehmigung der Medizinischen
Fakultät der Universität München

1. Berichterstatter:	Prof. Dr. med. N. Plesnila
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. med. A. Straube
Mitberichterstatte:	Prof. Dr. med. F. Christ
	Prof. Dr. med. B. F. Becker
Dekan:	Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR
Tag der mündlichen Prüfung:	22.07.2010

Meiner Mutter
Nonna und Nonno
meinem Vater

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	4
1.1. Einführung	4
1.2. Intrakranieller Druck	6
1.3. Zerebrale Durchblutung.....	7
1.4. Vasospasmus.....	7
1.5. Systemische Folgen der Subarachnoidalblutung.....	8
1.6. Thromben	9
1.7. Wirkung von Kohlendioxid	10
2. Material und Methoden	11
2.1. Versuchstiere	11
2.2. Versuchsdurchführung	11
2.2.1. Narkose	11
2.2.2. Beatmungsparameter	12
2.2.3. Rektale Temperaturkontrolle.....	12
2.2.4. Präparation der Hirndruckmessung	12
2.2.5. Induktion der Subarachnoidalblutung.....	13
2.2.6. Überleben und neurologischen Funktion nach SAB.....	14
2.2.7. Vorbereiten der Intravitalmikroskopie.....	14
2.2.7.1. Narkose.....	14
2.2.7.2. Blutdruckmonitoring.....	14
2.2.7.3. Venöser Zugang.....	15
2.2.7.4. Trepanation	15
2.2.8. Intravitalmikroskopie	16
2.2.8.1. Anfärben des Plasmas	16
2.2.8.2. Durchführung.....	16
2.2.8.3. Auswertung	18

2.2.8.4.	Bestimmung des Gefäßdurchmessers	18
2.2.8.5.	Quantifizierung von Thromben	19
2.2.9.	Untersuchungsmethoden der pialen Mikrozirkulation	20
2.2.9.1.	Aufsuchen der Gefäße	20
2.2.9.2.	Beatmung mit verschiedenen Frequenzen	21
2.2.9.3.	Beatmen mit 10% Kohlendioxid.....	22
2.2.9.4.	Anwendung von Papaverin.....	23
2.2.9.5.	Strahler-Schema	26
2.2.10.	Hemmung der Thrombozytenaggregation	27
2.2.10.1.	Vorversuche	27
2.2.10.2.	Intraoperative Parameter und neurologische Funktion.....	28
2.2.11.	Versuchsgruppen.....	28
2.2.12.	Statistik	29
3.	Ergebnisse.....	31
3.1.	Intrakranieller Druck	31
3.2.	Verteilung des Blutes im Subarachnoidalraum	32
3.2.1.	Makroskopische Betrachtung der Blutverteilung	32
3.2.2.	Mikroskopische Betrachtung der Blutverteilung	32
3.3.	Outcome nach Subarachnoidalblutung.....	34
3.3.1.	Letalität	34
3.3.2.	Gewichtsverlauf	35
3.4.	Beatmung mit verschiedenen Frequenzen	36
3.5.	Beatmen mit 10% Kohlendioxid.....	39
3.6.	Anwendung von Papaverin.....	42
3.7.	Strahler-Schema.....	43
3.8.	Mikrovasospasmen.....	45
3.9.	Thromben	48
3.10.	Hemmung der Thrombozytenaggregation	53

4. Diskussion	58
4.1. Methoden	58
4.1.1. Auswahl des Versuchstieres	58
4.1.2. Narkose	58
4.1.3. Induktion der Subarachnoidalblutung.....	59
4.1.4. Intravitalmikroskopie	61
4.1.5. Strahler-Ordnungsschema	62
4.2. Ergebnisse	63
4.2.1. Intrakranieller Druck.....	63
4.2.2. Verteilung des Blutes im Subarachnoidalraum	64
4.2.3. Outcome	65
4.2.4. Gestörte CO ₂ -Reaktivität und Verhalten auf Papaverin	66
4.2.5. Strahler-Schema	68
4.2.6. Mikrovasospasmen	69
4.2.7. Thromben.....	71
4.2.8. Hemmung der Thrombozytenaggregation	72
5. Zusammenfassung und Ausblick	74
A. Literaturliste	76
B. Danksagung	91
C. Lebenslauf	93

1. Einleitung

1.1. Einführung

Nach kardio-vaskulären Ereignissen und malignen Prozessen stehen zerebrovaskuläre Erkrankungen an dritter Stelle der Todesursachen in der westlichen Welt¹⁰⁸. Eine wichtige Erkrankung aus der Familie der zerebrovaskulären Erkrankung ist die Subarachnoidalblutung (SAB). Dies ist eine akute, lebensbedrohliche Blutung in den Subarachnoidalraum, den Raum zwischen Arachnoidea und Pia Mater. Sie ist am häufigsten durch die Ruptur eines Aneurysmas bedingt, kann jedoch gelegentlich auch traumatische Ursachen haben. Die ersten klinischen Zeichen für eine SAB sind schlagartig einsetzende heftigste Kopfschmerzen, häufig mit Bewusstlosigkeit vergesellschaftet. Durch die Reizung der Hirnhäute sind fast immer Meningismus-Zeichen vorhanden. Der rapide Anstieg des Hirndrucks kann zu Übelkeit und Erbrechen führen, manchmal sind jedoch auch nur unspezifische Zeichen wie ein Schmerz im Thorax- und Schulterbereich die ersten Symptome. Nach Einlieferung in ein Krankenhaus wird hier häufig mit Hilfe einer Computertomographie (CT) die Diagnose durch den Nachweis von Blut im Subarachnoidalraum gestellt. Die Verteilung des Blutes gibt außerdem einen Hinweis auf die Lokalisation des Aneurysmas. Die Sensitivität des CT sinkt von 98% innerhalb der ersten 12 Stunden nach Blutung auf 75% am 3. Tag und auf 50% am 7. Tag. Ein unauffälliges CT kann bei kleinen oder Tage zurückliegenden Aneurysmablutungen vorkommen. Die Kernspintomographie ist am 1. Tag der Blutung mit modernen Flairsequenzen und dem Gradientenecho ähnlich sensitiv wie das CT und kann Blutungen, die bereits Tage zurückliegen, durch den Hämosiderinnachweis mit höherer Sensitivität aufzeigen^{5,131,132}. Bei unklaren Befunden kann darüber hinaus eine Lumbalpunktion durchgeführt werden, um Liquor zu gewinnen. Dieser kann bei einer SAB durch Blutabbauprodukte gelblich gefärbt sein (xantochromer Liquor), und es lassen sich Granulozyten nachweisen, die Hämoglobin phagozytiert haben (Siderophagen). Jedoch gibt es bei der Lumbalpunktion auch falsch-positive und falsch-negative Befunde¹⁴⁰. Einzig ein wasserklarer, unauffälliger Liquor schließt eine SAB innerhalb der letzten 2-3 Wochen aus³⁸. Die Schwere einer SAB wird seit 1968 nach Hunt und Hess⁶⁹ bzw. seit 1988 nach einer Klassifikation der „World Federation Of Neurological Surgeons“ (WFNS)¹⁸³ anhand der „Glasgow Coma Scale“ (GCS) wie folgt eingeteilt:

WFNS		Hunt und Hess
Grad	GCS	Kriterien
I	15	asymptomatisch, leichte Kopfschmerzen, leichter Meningismus
II	14-13	starke Kopfschmerzen, Meningismus, keine fokale Neurologie außer Hirnnervenstörungen
III	14-13/Hemiparese	Somnolenz, Verwirrtheit, leichte fokale Neurologie
IV	12-7	Sopor, mäßige bis schwere Hemiparese, vegetative Störungen
V	6-3	Koma, Einklemmungszeichen

Die SAB ist zwar mit 13 – 30/100000 nur für 6-10% aller Schlaganfälle verantwortlich, führt jedoch mit 22 - 25% aller zerebro-vaskulären Todesfälle ausnehmend häufig zum Tod und ist darüber hinaus überproportional für volkswirtschaftliche Defizite verantwortlich^{23,108,198}. Letzteres liegt zum einen daran, dass ca. 70% aller Patienten zwischen 25 und 65 Jahren alt sind und sich somit in einem volkswirtschaftlich produktiven Alter befinden und zum anderen an der hohen Rate der Morbidität und Mortalität. Beinahe 25% der Patienten versterben noch bevor sie das Krankenhaus erreichen und nur ungefähr 10% aller initial komatösen Patienten erholen sich wieder vollständig. Ungefähr 70% der initial komatösen Patienten versterben in den ersten 6 Monaten, wobei 18 – 24% innerhalb der ersten 24 Stunden versterben. Weitere 24 Stunden später beträgt die Mortalität ~35%. Nach einer Woche sind 33 – 41% und nach 30 Tagen 40 – 49% verstorben. Dies zeigt deutlich, dass der initiale Schaden, welcher durch die initiale Blutung und in den folgenden 48 Stunden erfolgt, den größten Beitrag zur Mortalität leistet^{1,7,106,145}. Die wichtigste Ursache für die extrem hohe Mortalität und Morbidität ist die sich entwickelnde zerebrale Ischämie, welche wiederum zur neuronalen Zellschädigung und schließlich zum Zelltod führt²¹. Somit stellt

sich die Frage, was schließlich zur Ischämie nach SAB führt. Hierfür sind unter anderem zwei wesentliche Pathomechanismen verantwortlich, deren genauer Beitrag zum Schaden nach SAB bis heute nicht vollständig verstanden ist: zum einen der drastische Anstieg des intrakraniellen Drucks (ICP) und andererseits das deutliche Absinken der zerebralen Durchblutung (CBF).

1.2. Intrakranieller Druck

Der normale ICP bei gesunden Menschen liegt, je nach Körperlage, zwischen 0 und 5 mm Quecksilbersäule (mmHg). Nach initialer Blutung wurden in Studien beim Menschen sehr breit gestreute Werte beobachtet, die zwischen 28 und über 150 mmHg lagen^{34,50,77}. Verschiedene Tiermodelle zeigten spezies- und methodenabhängig Werte zwischen 60 und 120 mmHg^{8,78,99,129,151,170}. Alle Studien und Tiermodelle ähneln sich jedoch in der Erklärungsweise des Pathomechanismus: nach Ruptur des Aneurysmas kommt es durch den Blutaustritt zunächst zu einem sprunghaften Anstieg des ICP bis auf Höhe des mittleren arteriellen Drucks (MAP). Da sich der zerebrale Perfusionsdruck (CPP) nach der Formel

$$\mathbf{CPP = MAP - ICP}$$

berechnet, sinkt mit Anstieg des ICP der CPP zunächst ab. Dieses wird mit Hilfe des Cushing Reflexes partiell kompensiert. Der Cushing Reflex beschreibt einen reflektorischen Anstieg des MAP bei Anstieg des ICP⁴⁷. Dieser Kompensationsmechanismus ist jedoch begrenzt und kann den Abfall der zerebralen Durchblutung bei extrem hohen ICP-Werten nicht verhindern. Da das menschliche Gehirn auf erhöhte ICP-Werte sehr empfindlich reagiert, stellt der ICP Anstieg nach SAB eine ernste Bedrohung dar¹³⁵. Neben der direkten Einwirkung des austretenden Blutes spielt das sich entwickelnde Hirnödem eine signifikante Rolle für die Entwicklung des ICP. Nach einer SAB entwickelt sich sehr rasch ein zytotoxisches Hirnödem. Dieses Hirnödem wird in der Folge durch eine schwere Störung der Bluthirnschranke, einer Störung der vaskulären Homöostase und einem konsekutiven Übertritt von Flüssigkeit aus den Gefäßen in das Interstitium noch weiter verstärkt. Auch hier spielt wiederum die Einbettung des Gehirnes in die starre Kalotte eine wesentliche Rolle, was die druckatrophische Schädigung des Gehirns durch das sich entwickelnde Gehirnödem noch verstärkt^{17,35,82,97}.

1.3. Zerebrale Durchblutung

Wie oben bereits erwähnt, sinkt die zerebrale Durchblutung unmittelbar nach der ersten Blutung drastisch. Dies basiert zunächst einmal auf der Erniedrigung des zerebralen Perfusionsdruckes. Jedoch bleibt der CBF beim Menschen 2-14 Tage nach dem akuten Ereignis reduziert und zeigt nur eine langsame Erholungstendenz. Mit Hilfe verschiedener bildgebender Verfahren, wie Single Photon Emission Computed Tomography (SPECT), wurden Reduktionen des CBF auf 36% bis 85% im Vergleich zu gesunden Kontrollprobanden gemessen^{54,75,118,134}. Der Pathomechanismus der langfristigen Reduktion des CBF ist bis heute nicht in allen Details geklärt. Es handelt sich mit Sicherheit um einen multimodalen Prozess, bei dem unter anderem folgende Faktoren diskutiert werden: Anstieg von Endothelin, Oxyhämoglobin, freie Radikale^{49,83,84,176}; Abfall von Stickstoffmonoxid- (NO-) und Kohlendioxid- (CO₂-) Reaktivität^{11,26,59,63,73,115}. Die bekannteste und am meisten diskutierte Komplikation nach einer SAB stellt jedoch der Vasospasmus dar. Dieser wird häufig auch für die Reduktion des CBF verantwortlich gemacht. Jedoch sind beim Menschen innerhalb der ersten zwei Tage nach SAB, in welchen bereits eine Reduktion des CBF nachgewiesen werden kann in aller Regel keine Vasospasmen der großen Gefäße präsent.

1.4. Vasospasmus

Der Vasospasmus als eine Ursache für die Mortalität und Morbidität nach SAB wird seit 1949 diskutiert¹⁵³. Ungefähr 50 – 70% aller Patienten mit SAB entwickeln einen angiographisch nachweisbaren Vasospasmus, jedoch nur 19 – 46% zeigen daraufhin die Symptome eines verzögerten ischämischen neurologischen Defizits (DIND)^{100,192}. Im klinischen Alltag wird der Vasospasmus jedoch meist nicht per Angiographie, sondern mit Hilfe der transkraniellen Dopplersonographie (TCD) bestimmt. Mit Hilfe dieses nicht-invasiven Verfahrens können die Flußgeschwindigkeiten in den größeren Hirngefäßen bestimmt werden. Beispielsweise ist bekannt, dass Flußgeschwindigkeiten größer 120 cm/s in der Arteria cerebri media (MCA) mit einer Kontraktion eben jenes Gefäßes um ca. 50% korrelieren². Jedoch zeigen auch Patienten mit einem weder angiographisch noch mittels TCD nachweisbaren Vasospasmus häufig DIND's^{76,179,191}. Zudem wirft der eingeschränkte Erfolg der etablierten Tripel-H-Therapie die Frage auf, ob Vasospasmen der großen Gefäße die Hauptrolle in der Pathologie der SAB spielen. Tripel-H steht für die Anfangsbuchstaben von Hypertension, Hypervolämie und Hämodilution. Das Prinzip dieser Therapie basiert auf der Idee einerseits den Blutdruck zu erhöhen und andererseits die Viskosität des Blutes

herabzusetzen. Hiervon verspricht man sich eine Verbesserung der Durchblutung des Gehirns. Die Hypervolämie und Hämodilution wird durch die Infusion von 500 – 1000 ml 10%iger Hydroxyläthylstärke-Lösung pro Tag und von 3000 – 10000 ml kristalloider Lösung pro Tag erreicht. Als Mittel der Wahl zum Erreichen der Hypertension gilt eine kontinuierliche Infusion mit Dopaminhydrochlorid von 3 – 30 µg/kg KG pro Minute. Bei geclippten Aneurysmata werden systolische Blutdruckwerte von bis zu 240 mmHg angestrebt. Jedoch hat auch diese Therapiemethode nur eingeschränkte Erfolge^{95,107}. Da zudem mit Hilfe der Angiographie und der TCD nur eine Aussage über den Zustand der größeren Hirngefäße getroffen werden kann und eine Reduktion des Durchmesser in den großen, Blut zuleitenden Gefäßen des Gehirns nur eine relativ geringe Reduktion des in der Peripherie gemessenen CBF nach sich zieht^{43,65}, stellte sich sehr bald die Frage, ob Vasospasmen auch auf der Ebene der Mikrozirkulation existieren^{112,113,136,137,171}. Erstmals wurde 2003 der Nachweis für Mikrovasospasmen beim Menschen geführt¹⁸⁷. Das Ziel unserer Arbeit war nun unter anderem ein verlässliches tierexperimentelles Model für die Untersuchung der Mikrovasospasmen zu entwickeln und diese dann eingehend zu quantifizieren.

1.5. Systemische Folgen der Subarachnoidalblutung

Zwar beschäftigt die SAB vornehmlich Ärzte und Ärztinnen aus dem neurologischen Stoffgebiet (Neurologen, Neurochirurgen, Neuroradiologen...), jedoch gibt es auch Komplikationen und Folgen der SAB, die nicht nur das zentrale Nervensystem betreffen. Sehr häufig ist das kardiovaskuläre System nach SAB von Komplikationen betroffen. Aktuelle Studien zeigen hier eine Inzidenz von 39% bis 63% aller SAB Patienten^{56,130,177}. Die häufigsten kardiovaskulären Symptome sind das sogenannte „gelähmte Mykoard“ mit vermindertem kardialen Schlagvolumen, wohingegen der systemische Blutdruck und auch der pulmonal-arterielle Druck häufig erhöht sind. Auch findet sich gehäuft ein Anstieg der Herzenzyme, besonders der CK-MB und des Troponin I^{141,148}.

Der Anstieg des pulmonal-arteriellen Blutdrucks ist allerdings nicht die einzige Komplikation nach einer SAB die Lunge betreffend. 20% bis 80% aller Patienten nach einer SAB leiden entweder unter einer „acute lung injury“ (ALI), einem „acute respiratory distress syndrome“ (ARDS), einem „neurogenic pulmonary edema“ (NPE), einer Pneumonie oder erleiden pulmonale Embolisierungen^{18,48,55,56}.

Seit langer Zeit bekannt und in der Literatur gut beschrieben sind auch die endokrinologischen Komplikationen der SAB. Hier stehen an erster Stelle die Störungen des Natrium- und Wasser-Haushalts. 30 – 43% aller Patienten zeigen in der Akutphase nach SAB eine Hyponatriämie mit Serumnatriumwerten $<135 \text{ mmol/l}$ ^{157,184,195}. Die häufigsten Störungen, welche den veränderten Werten zugrunde liegt ist einerseits das „Syndrom der inadäquaten ADH Produktion“ (SIADH, Schwartz-Bartter-Syndrom) und das „zerebrale Salzverlustsyndrom“ (CSW). Im Rahmen des SIADH kommt es zu einer euvolämischen Hyponatriämie durch eine vermehrte Produktion bzw. Ausschüttung des antidiuretischen Hormons (ADH) aus dem Hypothalamus. Davon Abzugrenzen ist das CSW welches mit einer hypovolämischen Hyponatriämie ungeklärter Pathogenese einhergeht. Beide Störungen sind bei rechtzeitiger Diagnose - eine entsprechende Therapie vorausgesetzt – beherrschbar.

1.6. Thromben

Das Verhältnis zwischen Thrombenentstehung und -auflösung spielt eine äußerst wichtige Rolle in der Aufrechterhaltung der Durchblungsverhältnisse im menschlichen Organismus. Die Blutgerinnung des Menschen stützt sich auf drei Grundbestandteile: die Thrombozyten, die plasmatischen Bestandteile sowie die Gefäße. Einige Studien haben bis dato eine vermehrte Aktivität der Thrombozyten nach SAB nahegelegt ¹⁶⁸. Bei Patienten wurde ab drei Tage nach dem Blutungsereignis ein signifikant erhöhter Wert an Thromboxan A_2 nachgewiesen, besonders deutlich wenn die Patienten unter DIND's litten ^{85,86}. Thromboxan A_2 ist ein Prostaglandin, welches über den Cyclooxygenaseweg mit Hilfe der Thromboxan-Synthase gebildet wird. Thromboxan A_2 aktiviert die Thrombozytenaggregation durch Bindung an den Thromboxan-Rezeptor auf Thrombozyten und ist durch seine Bindung an die glatte Muskulatur darüber hinaus ein sehr potenter Vasokonstriktor ¹⁵⁰. Somit ist eine erhöhte Konzentration an Thromboxan A_2 im Blut von Patienten ein direkter Hinweis auf eine über die Maßen ablaufende Aktivierung von Thrombozyten und könnte auch zur Entstehung des Vasospasmus beitragen. Auch tierexperimentelle Daten sprechen für eine Beteiligung der Thrombozytenaggregation an der Pathophysiologie der SAB. Diese haben gezeigt, dass sowohl alleine die Ruptur einer Arterie als auch das Vorhandensein von Blut an der abluminalen Seite einer intakten Arterie eine vermehrte Thrombozytenaggregation bewirken kann ⁶⁷. Wie bereits erwähnt, spielt jedoch nicht nur die Aggregation selbst eine Rolle für die Hämostase, sondern deren Verhinderung. Und genau dies ist ebenfalls nach SAB gestört ¹³⁸.

1.7. Wirkung von Kohlendioxid

Kohlendioxid ist einer der wichtigsten Regulatoren der zerebralen Durchblutung und Homöostase^{60,121}. Auf welche Art und Weise CO₂ genau wirkt, ist bis heute nicht in allen Details verstanden. Es ist bekannt, dass ein Anstieg des arteriellen Kohlendioxid-Partialdruckes (PaCO₂) einen Anstieg des second Messengers „zyklisches Guanosinmonophosphat“ (cGMP) in der glatten Muskulatur der Arteriolen nach sich zieht. Dieser Anstieg von cGMP wiederum aktiviert membran-gebundene sarkoplasmatische Calcium-Pumpen, welche das intrazelluläre Calcium in das sarkoplasmatische Retikulum pumpen und somit die intrazelluläre Calcium-Konzentration reduzieren. Da an Calmodulin gebundenes Calcium für die Aktivierung der Myosin-Leichtketten-Kinase (MLCK) erforderlich ist, welche wiederum die Myosin-Leichtkette (MLC) phosphoryliert, was zur Kontraktion führt, sorgt die Entfernung des Calciums aus dem Intrazellulärraum für eine Relaxierung der glatten Muskelzelle und somit zu einer Zunahme des Gefäßdurchmessers^{72,196}. Seit den 1970ern wird eine Störung in der zerebralen CO₂ Reaktivität nach SAB diskutiert. Hierfür gibt es sowohl Hinweise bei Patienten als auch in verschiedenen Tiermodellen^{12,25,31,61,63,105,122,151,160}. Jedoch waren diese Hinweise bislang nur indirekt. Entweder wurde die Reaktion von CO₂ auf die Durchblutung mit TCD, Radiographie oder einem anderen Verfahren bestimmt^{62,152}, oder es wurde eine Angiographie durchgeführt^{32,118}. Bis jetzt gab es kein Tiermodell, welches die Veränderungen der CO₂-Reaktivität direkt sichtbar machen konnte. Ein solches Modell zu entwickeln war Ziel unserer Forschungen.

2. Material und Methoden

Die Untersuchungen wurden von 2005 bis 2008 im Institut für chirurgische Forschung der Ludwig-Maximilians-Universität in der Arbeitsgruppe für experimentelle Forschung (Leitung: Prof. Dr. med. N. Plesnila) mit Genehmigung der Regierung von Oberbayern (Tierversuchsantrag 552-1-54-2531-6-04) durchgeführt.

2.1. Versuchstiere

Die Experimente wurden an männlichen C57/Bl6 Mäusen (Charles River, Sulzfeld, Deutschland) mit einem Gewicht von 20 – 25g durchgeführt, entsprechend einem Lebensalter von 6 – 12 Wochen. Die Tiere wurden im Tierstall des Instituts für Chirurgische Forschung mit freiem Zugang zu Wasser und Futter (Trockenfutter, Ssniff Spezialdiäten, Soest, Deutschland, mit 18000 I.E./kg Vitamin A, 1280 I.E./kg Vitamin D3, 120 mg/kg Vitamin E) gehalten. Die Tierkäfige wurden in einem vollklimatisierten Raum bei ca. 20°C und ungefähr 60% Luftfeuchtigkeit untergebracht. Über eine Zeitschaltuhr wurde ein konstanter zwölfständiger Tag-/Nachtrhythmus eingehalten.

2.2. Versuchsdurchführung

2.2.1. Narkose

Die Einleitung der Narkose erfolgte durch eine intraperitoneale Injektion einer Kombination aus 0,5 mg/kg KG Medetomidin (Domitor, Pfizer GmbH, Karlsruhe, Deutschland), 5 mg/kg KG Midazolam (Midazolam-Hameln, Hameln Pharmaceuticals, Hameln, Deutschland) und 0,05 mg/kg KG Fentanyl (Fentanyl, Pfizer GmbH, Karlsruhe, Deutschland). Anschließend erfolgte die Intubation unter Sicht in 45° Kopfhochlage-

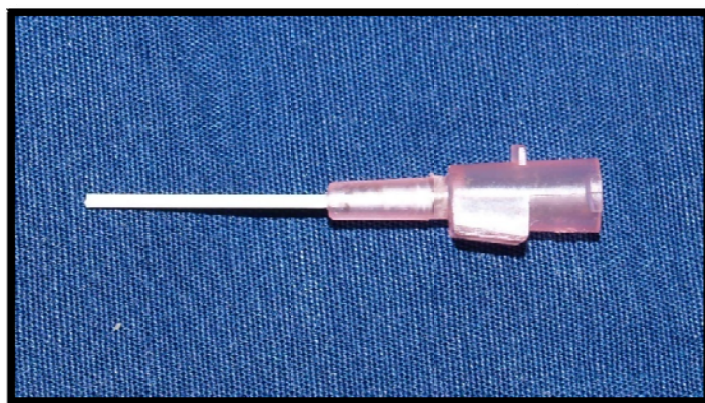


Abbildung 1. Tubus

rung mit Hilfe eines OP-Mikroskops (OpMi-1, Carl Zeiss, Jena, Deutschland). Die korrekte Lage des Tubus wurde durch die Mikrokapnographie kontrolliert (MicroCapnoGraph CI240, Columbus Instruments, Columbus, USA); eine deutlich sichtbare CO₂-Kurve auf dem Mikrokapnographen diente zusätzlich zur Sicht als ein sicheres Zeichen für eine gelungene Intubation. Als Tubus diente eine Eigenkonstruktion¹⁹⁹, bestehend aus einer Venenverweilkanüle der Größe 20 Gauge. Sie wurde in der Länge auf 1,2 cm gekürzt. Darüber hinaus wurde das Ansatzstück mit einem Loch versehen, passend für die Meßsonde der Mikrokapnographie. Nach erfolgreicher Intubation wurde das Tier mit einem Kleintier-Respirator (Minivent Typ 845, Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten) verbunden und mit einem Gasgemisch aus 35% Sauerstoff und 65% Raumluft beatmet.

2.2.2. Beatmungsparameter

Die Beatmung wurde bezüglich Atemfrequenz und endtidalem Kohlendioxidpartialdruck (P_{ET}CO₂) durch einen Mikrokapnographen kontrolliert. Das Gerät bestimmt die Atemfrequenz und den P_{ET}CO₂ mit einer Frequenz von 10 Hz. In seiner Messkammer wird mit Hilfe von Infrarotlicht, einem optischen Bandpassfilter und einem Detektor die Konzentration an CO₂ in der Probe gemessen. Die Beatmung wurde mit einer Atemfrequenz zwischen 130 und 175 Atemzügen pro Minute und einem Atemzugvolumen zwischen 200 und 225 µl so gesteuert, daß der P_{ET}CO₂ sich zwischen 35 mmHg und 45 mmHg befand.

2.2.3. Rektale Temperaturkontrolle

Nach Einleitung der Narkose wurde eine Temperatursonde rektal eingeführt und mit einem Temperaturregler (FHC Temperature Control, Bowdoinham, USA) verbunden, welches über eine Heizplatte, auf der die Maus platziert wurde, die Körpertemperatur bei 37°C konstant hielt.

2.2.4. Präparation der Hirndruckmessung

Das Tier wurde in Bauchlage positioniert und die Kopfhaut medial ca. 1 cm lang inzidiert. Nach Entfernung der Galea aponeurotica wurde der rechte Musculus temporalis dargestellt. Dieser wurde von oben inzidiert und stumpf nach lateral gedrängt. Orientierend wurde die durchschimmernde Arteria cerebri media aufgesucht und kaudal von dieser ein Bohrloch zur Einbringung der ICP-Sonde gefräst (Bohrmaschine: Uni-Drive N, Paggen Werkzeugtechnik, Starnberg, Deutschland; Fräskopf: Aesculap GD870R, 0,5x5,1 mm, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland).

Anschließend wurde die ICP-Sonde (Codman MicroSensor Basic, Codman, Norderstedt, Deutschland) epidural eingebracht. Die Sonde wurde an der Kalotte mit Hilfe von Knochenzement (Poly-F Plus Bondex, Dentsply DeTrey, Konstanz, Deutschland) fixiert und anschließend mit dem ICP-Monitor (ICP Express, Codman, Norderstedt, Deutschland) verbunden. Dieser Monitor liefert mit einer Auflösung von 1 Hz den gemessenen Hirndruck in mmHg.

2.2.5. Induktion der Subarachnoidalblutung

Das Tier wurde nun in Rückenlage positioniert und die SAB durch ein modifiziertes Fadenmodell nach Bederson induziert¹¹. Hierfür wurde auf der linken Seite ca. 1 mm lateral der Medianlinie ein Hautschnitt vom Sternum bis zur Mandibula ausgeführt. Nach Darstellung der Carotis-Gabel wurde zunächst die Arteria thyroidea ligiert. Der Knoten der Ligatur dieses Gefäßes hilft bei den folgenden Schritten. Anschließend wurde die Arteria carotis externa ca. 0,3 cm distal der Bifurkation legiert. Als nächstes wurde ein weiterer Ligaturfaden ca. 0,1 cm distal der Bifurkation vorgelegt. Nach Clipping der Arteria carotis communis und interna wurde die Arteria carotis externa

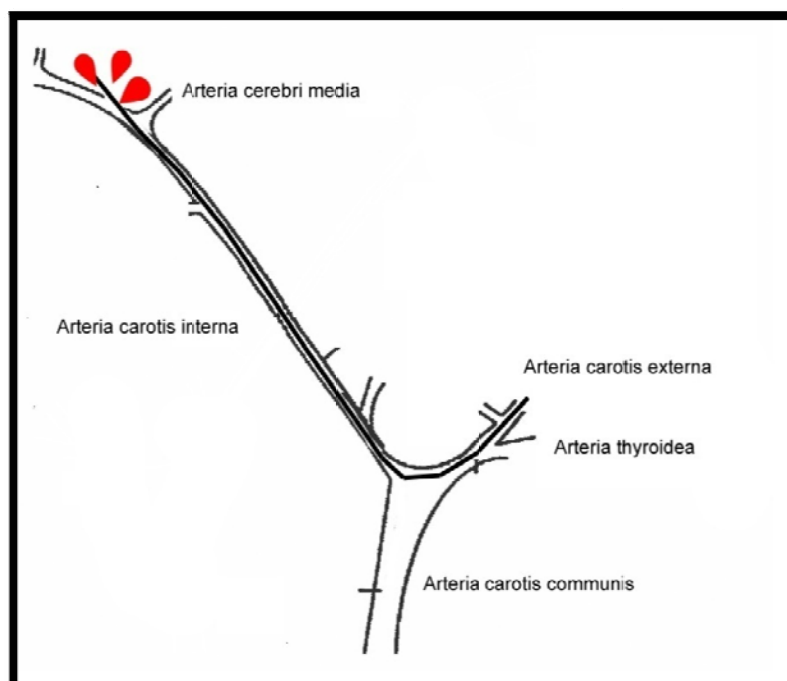


Abbildung 2. Fadenmodell der SAB, modifiziert nach Bederson et. al.

mit einer Mikroschere zwischen den beiden Ligaturen eröffnet und ein monofiler Faden (Prolene 5-0, Länge 3cm, Ethicon, Norderstedt, Deutschland) in die Arteria carotis externa eingeführt. Anschließend wurde dieser Faden mit der vorgelegten Ligatur fixiert und das Gefäß damit abgedichtet. Nach Entfernung der beiden Clips wurde die

Arteria carotis externa durchtrennt und der Perforationsfaden in die Arteria carotis interna vorgeschoben. Daraufhin wurde der Faden innerhalb der Arteria carotis interna vorangeschoben bis ein prompter, massiver ICP-Anstieg beobachtet wurde. Dies ist das Zeichen für die erfolgte Auslösung der SAB¹⁵⁹. Sofort nach Beobachtung des ICP-Anstieges wurde der Perforationsfaden bis in den Stumpf der Arteria carotis externa zurückgezogen und dieses Gefäß mit Hilfe der Ligatur anschließend verschlossen. Während des gesamten Eingriffes betrug die Verschlusszeit der Arteria carotis interna maximal 3 Minuten. Anschließend wurde die Wunde vernäht (Ethibond 5-0, Ethicon, Norderstedt, Deutschland). Nach Entfernen der ICP-Sonde wurde die Kopfhaut mit einem Faden der gleichen Stärke verschlossen. Die Narkose wurde mit einer Kombination aus 2,5 mg/kg KG Atipamezol, 0,5 mg/kg KG Flumazenil und 1,2 mg/kg KG Naloxon antagonisiert und das Tier nach Wiedererlangen der Reflexe extubiert und in den Tierkäfig zurückgelegt. Danach wurde der Käfig für 24 Stunden in einem Inkubator bei 32°C und 25% Luftfeuchtigkeit gelagert.

2.2.6. Überleben und neurologischen Funktion nach SAB

Nach erfolgter SAB wurde eine Kontrollgruppe, bestehend aus sechs Tieren, für sieben Tage beobachtet. Das Überleben sowie das Körpergewicht wurde täglich zur gleichen Uhrzeit gemessen. Um auszuschließen, daß die beobachtete Mortalität und die Veränderungen im Gewichtsverlauf auf eine Infektion nach der erfolgten SAB Operation zurückzuführen ist, wurde einer weiteren Gruppe aus sechs ebenfalls operierten Tieren nach SAB für sieben Tage täglich zur selben Zeit 1 ml/kg KG eines 2,5%igen Antibiotikums (Enrofloxacin Baytril®, Bayer HealthCare, Leverkusen, Deutschland) subkutan appliziert^{156,190} und auch in dieser Gruppe das Überleben und der Gewichtsverlauf in den folgenden sieben Tagen verfolgt.

2.2.7. Vorbereiten der Intravitalmikroskopie

2.2.7.1. Narkose

3 Stunden bzw. 24 Stunden nach Induktion der SAB wurde die Narkose erneut wie unter 2.2.1. beschrieben eingeleitet.

2.2.7.2. Blutdruckmonitoring

Zur kontinuierlichen Blutdruckmessung wurde ein Katheter mit angeschlossenen Drucksensor in die Arteria femoralis eingeführt. Hierfür wurde das Tier auf dem Rücken positioniert, das linke Bein in gestreckter Haltung fixiert und die Haut des

Beines ventral ca. 2 cm inzidiert, die Faszien durchtrennt, die Muskulatur stumpf zur Seite gedrängt und die Arteria und Vena femoralis dargestellt. Zunächst wurde die Arteria femoralis distal legiert und anschließend eine Ligatur um die Arterie vorgelegt. Nach dem die Arterie proximal mit einem Clip verschlossen wurde, wurde sie inzidiert und ein Katheter (Aussendurchmesser: 0,61 mm, Innendurchmesser: 0,28 mm, Polythene Katheter, SIMS Portex, Großbritannien) eingeführt. Der Katheter war mit einem Druckwandler (DTX Plus DT-XX, Becton-Dickinson Medical, Heidelberg, Deutschland) verbunden, dessen Daten mit Hilfe einer Analog-Digital Wandlerkarte (Adlink AD 9112, Düsseldorf, Deutschland) und einer Datenerfassungssoftware (DasyLab 5.0, measX, Mönchengladbach, Deutschland) auf einem PC angezeigt wurden. Um einen Verschluss der Arterie zu verhindern, wurde der Katheter kontinuierlich mit einer 0,9%igen NaCl-Lösung mit einer Flußrate von 0,4 ml/h mit Hilfe einer Infusionspumpe (Perfusor Secura, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) perfundiert.

2.2.7.3. Venöser Zugang

Um den für die Intravitalmikroskopie benötigten Farbstoff (siehe 2.3.8.1.) zu applizieren, wurde ein Katheter mit denselben Abmessungen mit der oben beschriebenen Technik in die Vena femoralis des linken Beines eingebracht.

2.2.7.4. Trepanation

Für die nun folgenden Schritte wurde das Tier in Bauchlage gedreht und mit dem Kopf in einer stereotaktische Halterung fixiert, um eine Bewegung beim Fräsen des Schädelfensters und bei den anschließenden Messungen sicher auszuschließen. Nach Wiedereröffnung des Hautschnittes an der Kopfhaut, welcher nach der SAB verschlossen wurde, wurde die Kopfhaut mit vier Fäden (Ethibond 5-0, Ethicon, Nordstedt, Deutschland) am rostralen und kaudalen Ende des Hautschnittes durchstoßen, aufgespannt und somit ein Trichter von ca. 1 cm Höhe erzeugt. Die Galea aponeurotica und das Periost wurde auf der linken Seite sorgfältig entfernt. Mit einem elektrischen Bohrer (Uni-Drive N, Paggen Werkzeugtechnik, Starnberg, Deutschland) und einem darin eingespannten Fräskopf (Aesculap GD870R, 0,5x5,1 mm, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) wurde nun die Kalotte unter kontinuierlicher Kühlung bis auf die Lamina interna abgefräst. Der dabei entstehende Knochendeckel der Abmessungen 0,5 x 0,5 cm wurde vorsichtig mit einer Pinzette entfernt. Dabei wurde besonders darauf geachtet, die Dura mater zu schonen. Tiere mit ver-

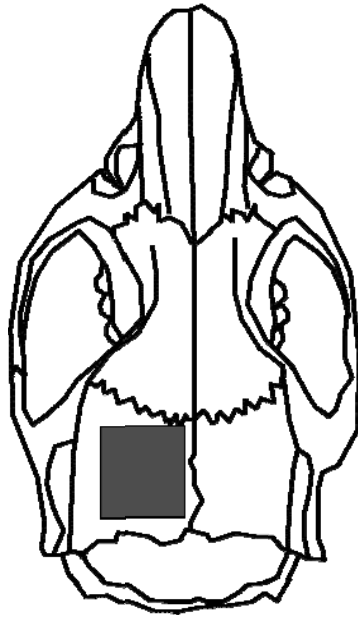


Abbildung 3. Schema eines Mausschädels und Lokalisation der Trepanation

letzter Dura mater wurden vom Versuch ausgeschlossen, da durch eine verletzte Dura mater eine zuverlässige Intravitalmikroskopie nicht möglich ist. Kleinere Blutungen aus den Gefäßen der Kalotte, welche nicht durch das Fräsen kauterisiert wurden, wurden mit kleinen Saugtupfern (Sugi, Kettenbach, Eschenburg, Deutschland) gestillt. Sofort danach wurde der durch das Spannen der Hautfäden entstandene Trichter mit 0,9%iger NaCl-Lösung gefüllt, um ein Austrocknen der Dura mater zu verhindern.

2.2.8. Intravitalmikroskopie

2.2.8.1. Anfärben des Plasmas

Mit Hilfe des vorher gelegten venösen Zuganges wurden nun 0,15 ml einer 0,5%igen Lösung von Fluoresceinisothiocyanat gebunden an Dextran (FITC-Dextran, Sigma Chemicals, Deisenhofen, Deutschland) appliziert. Dieses FITC-Dextran mit einem Molekulargewicht von 150.000 Dalton färbt das Plasma an (Exzitationsmaximum: 473 nm; Emmisionsmaximum: 514 nm) und ermöglicht somit das Sichtbarmachen der pialen Gefäße der Maus^{44,154}.

2.2.8.2. Durchführung

Das Versuchstier wurde nach den abgeschlossenen Vorbereitungen in der stereotaktischen Halterung mit dem Schädelfenster unter das Mikroskop auf einen von einem

Schrittmotor (IXE.C, Phytron, Gröbenzell, Deutschland) getriebenen Kreuztisch (Leitz, München, Deutschland) gelegt. Die Schrittmotoren waren elektronisch über einen PC und die entsprechende Steuerungssoftware (AlphaComm V3.4.2, Phytron Elektronik, Gröbenzell, Deutschland) in 1 µm Intervallen steuerbar. Durch die Anzeige und Aufzeichnung der jeweiligen Koordinaten des Kreuztisches konnten die identischen Gefäßsegmente über den gesamten Versuchszeitraum wieder aufgesucht, aufgezeichnet und anschließend analysiert werden. Für die Fluoreszenz-Epiillumatoren⁹ (L3, Ploemopak, Leica, München, Deutschland) wurde eine 75 Watt Xenon Lampe (XBO 75 W/2, Leitz, München, Deutschland) als Lichtquelle benutzt. Zunächst passierte das Licht einen 7mm Hitzefilter (Leitz, München, Deutschland) und eine Irisblende (Leitz, München, Deutschland), gefolgt von einem Anregungsfilter (Bandpassfilter 450 – 490 nm, Leitz, München, Deutschland). Nachdem das Licht über einen Teilerspiegel mit Reflexionskurzpassfilter (510 nm, Leica, München, Deutschland) gelenkt wurde, passierte es die Objektive (Salzwasser-Immersionsobjektiv 25x, 0,6 numerische Apertur oder Objektiv 10x, 0,22 numerische Apertur, Leitz, Wetzlar, Deutschland) und fiel auf das Schädelfenster. Das FITC-Dextran wurde hierdurch angeregt und erzeugte ein Fluoreszenzlicht der Wellenlänge 520 nm. Dieses gelangte durch das Objektiv zum Reflexionskurzpassfilter, an dem es aufgrund seiner größeren Wellenlänge abgelenkt wurde und im folgenden über einen Sperrfilter (Bandpassfilter 520 – 525 nm, Leica, München, Deutschland) und einen weiteren Spiegel zum Okular (Periplan 10x, Leitz, Wetzlar, Deutschland) bzw. direkt über einen C-Mount-Adapter an eine Kamera weitergegeben wurde. Bei dieser Kamera handelt es sich um eine Silizium Intensified Target (SIT) Restlichtkamera (C2400-08, Hamamatsu Photonics, Herrsching, Deutschland), welche durch eine besonders hohe Empfindlichkeit im Wellenlängenbereich von 400-650 nm charakterisiert ist. Die Bilder wurden mit einem Videorekorder (AG-7350, Panasonic, München, Deutschland) mit einer Frequenz von 50 Halbbildern/Sekunde auf S-VHS Videobändern (MQSE-120, Sony, Köln, Deutschland) aufgezeichnet. Ein Videozeitgenerator (For.Videotimer, Phytron Elektronik, Gröbenzell, Deutschland) erzeugte ein Zeit- und Datumssignal, welches simultan in das Videosignal eingespeist und mit aufgezeichnet wurde. Parallel wurden die Bilder auf einem Trinitron Farbvideomonitor (PVM-2730, Sony, Köln, Deutschland) angezeigt und konnten somit in Echtzeit verfolgt werden.

2.2.8.3. Auswertung

Die Bilder, die bei der Intravitalmikroskopie entstanden, wurden mit Hilfe eines Videorekorders (AG-7350, Panasonic, München, Deutschland) und einem Videomonitor (PVM-2730, Sony, Köln, Deutschland) wiedergegeben. Die gewünschten Einzelbilder wurden mit Hilfe einer Videokarte (Matrox, Dorval, Kanada) digitalisiert und mit einer PC-gesteuerten Bildauswertungssoftware (CapImage, Ingenieurbüro Dr. Zeintl, Heidelberg, Deutschland) ausgewertet. Auf dem Computersystem mit einem 15" Monitor wurde eine 790-fache Vergrößerung erreicht. Da die Auflösung des Videosystems bei 768x576 Bildpunkten festgelegt ist, lag die Pixelgröße horizontal bei 0,7067 μm und vertikal bei 0,5155 μm . Folglich liegt die Messgenauigkeit des Systems bei $\pm 1-1,4 \mu\text{m}$.

2.2.8.4. Bestimmung des Gefäßdurchmessers

Der Durchmesser der Gefäße wurde nach Beendigung der Versuche mit Hilfe der Videoaufnahmen bestimmt. Auf den Aufnahmen war deutlich die Grenze zwischen dem leuchtendem, mit FITC-Dextran angefärbten Plasma und dem dunklen Endothel zu erkennen. Die dabei ersichtlichen Gefäßgrenzen wurden mit dem Cursor angeklickt und eine Linie möglichst orthogonal zum Gefäßverlauf gezogen. Die Bildauswertungssoftware misst die Anzahl der Pixel entlang der gezogenen Linie und berechnet daraus die tatsächliche Länge, in diesem Fall den Durchmesser des zu untersuchenden Gefäßes. Jede Messung wurde dreimal ausgeführt und der Mittelwert hieraus gebildet, um die Messgenauigkeit weiter zu verbessern. Der hierbei ermittelte Wert wurde als Gefäßdurchmesser notiert (Abb. 4).

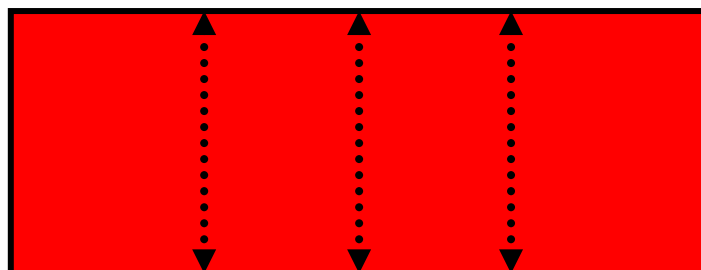


Abbildung 4. Schematische Darstellung der Bestimmung des Gefäßdurchmessers bei Vasospasmen. Die drei jeweils nebeneinanderstehenden Messungen wurden gemittelt, um den Gefäßdurchmesser zu erhalten.

Sollten Änderungen des Gefäßdurchmessers eines einzelnen Gefäßes über die Zeit bestimmt werden, wurde zunächst einmal der erste - wie oben beschrieben – gemessene Gefäßdurchmesser als Baseline herangezogen und als Referenzwert auf 100% gesetzt. Alle folgenden Durchmesser wurden als Prozentsatz des ersten gemessenen Durchmessers berechnet. Somit konnte ein relativer Verlauf des Durchmessers eines einzelnen Gefäßes bestimmt werden. Falls Vasospasmen sichtbar waren, wurde ein leicht hiervon abweichendes Schema genutzt. Zunächst wurde die Stelle mit dem größten Durchmesser dreimal gemessen und dieser Wert als Baseline genommen. Bei sich direkt daneben befindlichen Vasospasmen wurde die schmalste Stelle als Referenzwert herangezogen und schließlich Baseline- und Referenzwert miteinander verglichen (Abb. 5).

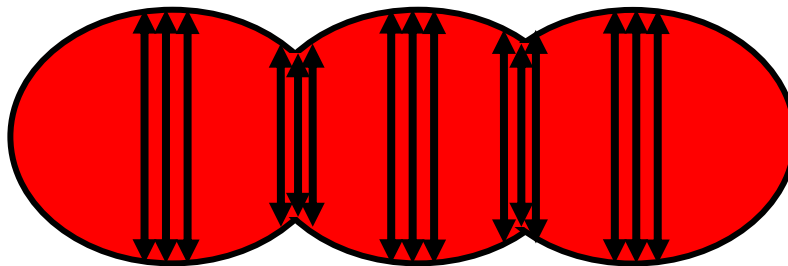


Abbildung 5. Schematische Darstellung der Bestimmung des Gefäßdurchmessers. Die drei Messungen wurden gemittelt, um den Gefäßdurchmesser zu erhalten.

2.2.8.5. Quantifizierung von Thromben

Bei der Auswertung der intravitalmikroskopisch gewonnenen Bilder fiel auf, daß es bei den vorhergegangenen Versuchen in den pialen Gefäßen zur Thrombenbildung kam. Diese imponierten durch ein deutlich am Endothel hängendes Konglomerat, welches durch die Reduktion des Plasmaflusses im Randbereich hell aufleuchtete. Die Anzahl dieser Thromben wurde ebenso bestimmt wie der zeitliche Verlauf ihres Auftretens, was aufgrund der mit aufgezeichneten Zeitdaten des Videozeitgenerators möglich war. Außerdem wurde festgehalten, ob der Thrombus in einem nicht-spastischen oder spastischen Gefäß angesiedelt war.

2.2.9. Untersuchungsmethoden der pialen Mikrozirkulation

2.2.9.1. Aufsuchen der Gefäße

Nach Positionierung des Versuchstieres wurde das Schädelfenster horizontal ausgerichtet. Zunächst wurde mit der Übersichtsvergrößerung (Objektiv 10x) die piale Mikrozirkulation dargestellt, um eine Übersicht über das zu untersuchende Areal zu ermöglichen. Als nächstes wurden Arterien und Arteriolen aufgesucht und als Äste der Arteria cerebri media identifiziert. Venen und Arterien unterscheiden sich schon vom bloßen Aspekt. Arterien treten eher vom lateralen Rand in das Beobachtungsfeld, gabeln sich immer weiter und dünnen sich schließlich bis in die kapillare Ebene aus. Venen hingegen laufen eher aus dem zentralen Beobachtungsfeld in den parietal laufenden Sinus sagittalis.

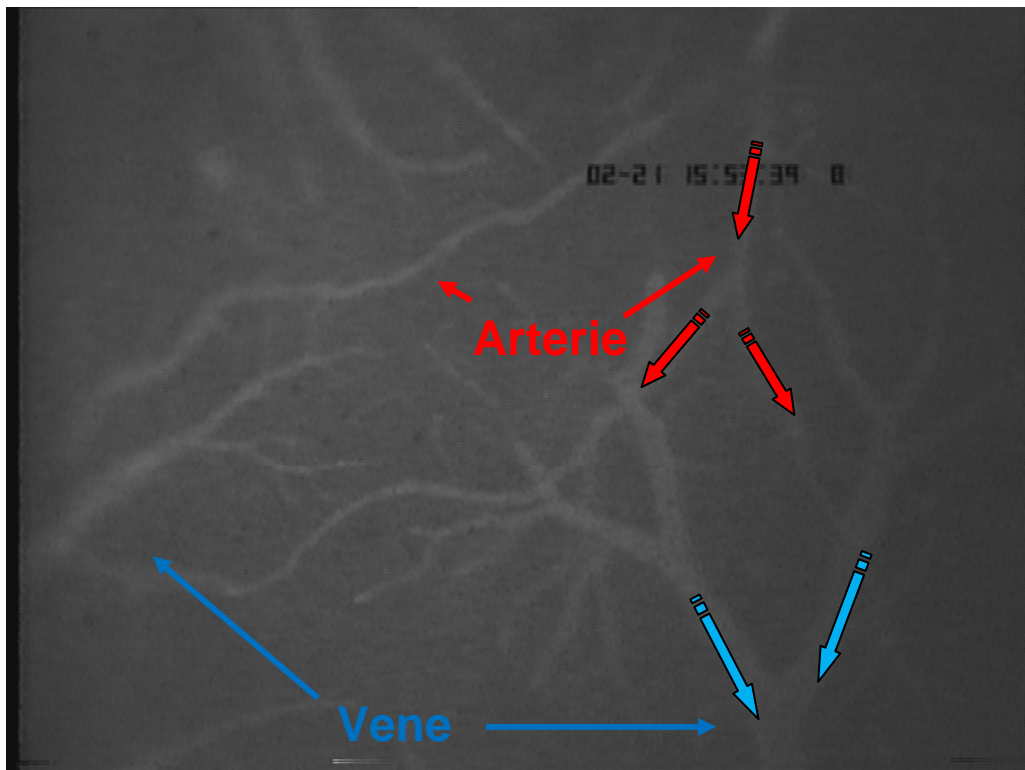


Abbildung 6. Exemplarische Übersichtsaufnahme der intravitalmikroskopisch betrachteten Region. Venen und deren Flußrichtung sind blau markiert, Arterien und deren Flußrichtung im Gegensatz dazu rot.

Ein weiteres wichtiges Kriterium zur Unterscheidung von Venen und Arterien war die Strömungsrichtung. An einer Gefäßgabel divergiert der Fluss von Arterien, wohingegen der Fluss von Venen konvergiert. Die Flußrichtung war jederzeit an Hand der Bewegung der Erythrozytenschatten im hell leuchtenden Plasma deutlich zu erkennen.

2.2.9.2. Beatmung mit verschiedenen Frequenzen

Da die Untersuchung derselben Gefäßabschnitte aus technischen Gründen nicht möglich war, benötigten wir für die Identifizierung und Quantifizierung des Vasospasmus eine Bezugsgröße. Unsere erste Überlegung war, mit Hilfe einer Hyperkapnie die Arterien zu dilatieren. Sollten die Gefäße nach einer SAB im Durchschnitt enger und somit spastisch sein, sollten sich diese bei einer Hyperkapnie um eine stärkere Differenz dilatieren als dies bei gesunden Tieren der Fall wäre. Dies wäre somit ein indirekter Hinweis auf eine stärkere, spastische Kontraktion der Gefäße nach SAB. Aus diesem Grund wurden zunächst drei Versuchsgruppen von Tieren gebildet. Jede Gruppe bestand aus sechs Tieren, mit jeweils ähnlichem Gewicht und Alter. Eine Gruppe bestand aus Tieren, die keine SAB Operation durchlaufen hatten (im Folgenden „Kontrolle“ genannt). Eine Gruppe wurde drei Stunden nach SAB weiter untersucht (im Folgenden „3h SAB“ genannt) und eine weitere Gruppe 24 Stunden nach SAB (im Folgenden „24h SAB“ genannt). In allen drei Gruppen liefen die Experimente nach dem gleichen Protokoll wie folgend beschrieben ab. Nach Induktion der SAB nach dem unter 2.3.5. erläuterten Model wurde nun, wie in 2.2.8.2. erklärt, das Tier mit dem Kraniotomiefenster unter das Intravitalmikroskop gelegt und die zu untersuchende Region im Stromgebiet der Arteria cerebri media dargestellt. Es wurden die Venen, welche im Sinne von Brückenvenen in den Sinus sagittalis drainieren, dargestellt und von den arteriellen Ästen der Arteria cerebri media unterschieden.

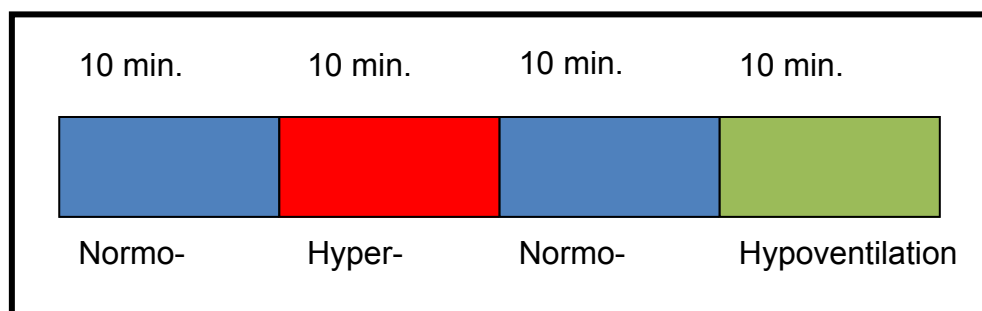


Abbildung 7. Zeitablauf der verschiedenen Beatmungsfrequenzen

Von diesen Ästen wurden drei Arterien für die folgenden Untersuchungen ausgewählt. Diese sollten jeweils über eine Gabelung verfügen und von mittlerem Durchmesser sein (30 – 40 μm). Zunächst wurde das erste Gefäß aufgesucht und der Status quo für 15 Sekunden auf Videoband festgehalten. Anschließend wurde zum nächsten Gefäß übergegangen und der Vorgang wiederholt. Nachdem auf diese Weise alle drei Gefäße dargestellt wurden, wurde mit Hilfe der durch die Steuerungssoftware des Kreuztisches angegebenen Koordinaten nach 5 Minuten der Meßzyklus wie oben beschrieben wiederholt. Diese Messungen wurden bei den nachfolgenden Auswertungen wie unter 2.2.8.4. beschrieben als Grundlage zur Bestimmung der Baseline genutzt. Anschließend wurden die Tiere mit einer Frequenz von 250 Atemzügen pro Minute hyperventiliert. Nach fünf Minuten Hyperventilation wurden die Gefäße wie oben beschrieben wieder aufgesucht und aufgezeichnet. Weitere fünf Minuten Hyperventilation später wurde dieser Vorgang ein weiteres Mal wiederholt. Daraufhin wurden die Tiere wieder mit ihrer Ursprungsfrequenz von 150-170 Atemzügen pro Minute beatmet und die Meßsequenz mit jeweils fünfminütigem Abstand erneut wiederholt. Nachdem die zehn Minuten bei erneuter Normoventilation beendet waren, wurden die Tiere hypoventiliert mit einer Frequenz von 70 Atemzügen pro Minute und ein weiteres Mal die genannte Meßsequenz durchlaufen. Zwei Minuten nach jeder Änderung der Beatmungsparameter wurden den Tieren über den arteriellen Katheter Blutproben abgenommen und in diesen der pH, Sauerstoffpartialdruck (PaO_2) und der Kohlendioxidpartialdruck (PaCO_2) bestimmt, um die Änderung der Blutgase zu verfolgen. Alle hierbei aufgezeichneten Bilder wurden nach Beendigung der Versuche wie unter 2.3.8.4. beschrieben ausgewertet.

2.2.9.3. Beatmen mit 10% Kohlendioxid

Da mit der oben erwähnten Methode der Hypoventilation einzig eine Hyperkapnie bis zu einem gewissen oberen Grenzwert erreicht werden kann, stellte sich die Frage, wie die Gefäße auf eine exogene Zufuhr von 10% Kohlendioxid und daraufhin folgend auf eine Hyperkapnie jenseits aller physiologisch erreichbaren Grenzen reagieren würden. Um dies zu untersuchen, wurden drei Versuchsgruppen mit je $n=6$ gebildet. Alle Gruppen bestanden aus sechs Tieren mit ähnlichem Gewicht und Alter. Eine Gruppe erhielt überhaupt keine Operation vor der Intravitalmikroskopie (im Folgenden genannt „Kontrolle“). Eine weitere Gruppe wurde drei Stunden nach SAB („3h SAB“) und eine Gruppe 24 Stunden nach SAB („24h SAB“) untersucht. Wie oben erwähnt, wurden pro Tier drei repräsentative Arterien aufgesucht und diese im

Verlauf für jeweils 10 Sekunden aufgezeichnet. Diese Aufzeichnungen wurden jeweils dreimal alle 15 Minuten wiederholt. Nachdem nun für 45 Minuten ein stabiler

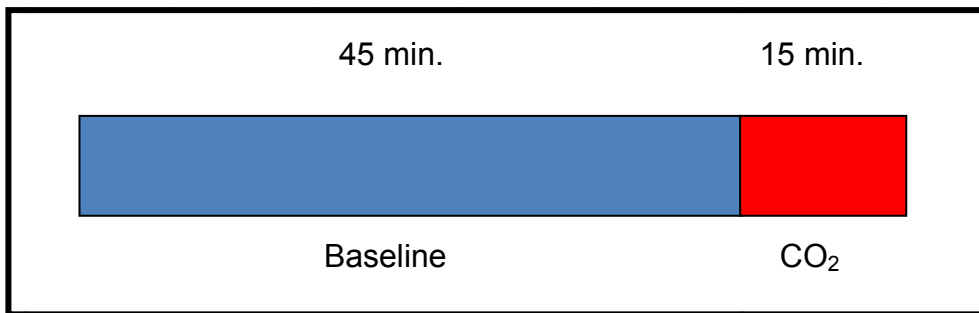


Abbildung 8. Zeitablauf der Beatmung mit Kohlendioxid

Baselinewert für den Gefäßdurchmesser bestimmt wurde, wurden die Tiere anschließend mit einem Gemisch aus 10% Kohlendioxid, 35% Sauerstoff und 55% Luft beatmet. Zwei Minuten nach Beatmung mit 10%igen CO₂ wurden den Tieren über den arteriellen Katheter Blutproben abgenommen und in diesen der pH, Sauerstoffpartialdruck (PaO₂) und der Kohlendioxidpartialdruck (PaCO₂) bestimmt, um die Änderung der Blutgase zu verfolgen. Fünf Minuten nach Beginn der Beatmung mit Kohlendioxid wurden die zuvor untersuchten Gefäße erneut aufgesucht und die Bilder aufgezeichnet. Nach weiteren zehn Minuten Beatmung wurde der Vorgang wiederholt. Die Auswertung der so gewonnenen Bilder erfolgte anschließend nach Abschluss des Versuches.

2.2.9.4. Anwendung von Papaverin

Bei Papaverin handelt es sich um ein toxisches, betäubendes Alkaloid, welches ursprünglich als Extrakt aus der Schlafmohnpflanze gewonnen wurde, heute jedoch fast

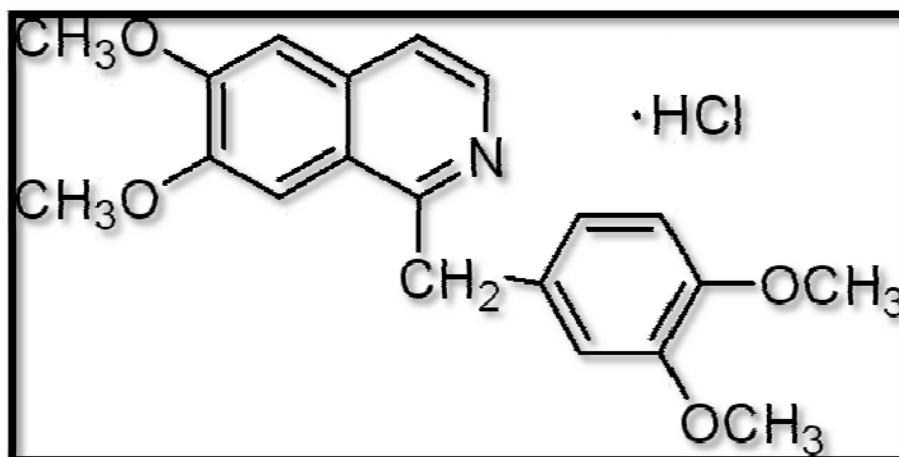


Abbildung 9. Strukturformel von Papaverin

ausschließlich synthetisch hergestellt wird. Papaverin ist ein äußerst potenter Relaxator glatter Muskelzellen. Dies geschieht durch eine Hemmung der zyklischen Nucleotidphosphodiesterase. Der dadurch entstehende erhöhte intrazelluläre Gehalt an zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP) hemmt den Kalziumeinstrom und somit die Kontraktion der glatten Muskulatur. Bis heute ist jedoch unklar, ob dies der einzige Wirkmechanismus ist ^{42,150}. Papaverin wirkt unabhängig von der neuralen Innervation ⁶⁴ auf die glatte Gefäßmuskulatur von z.B. Koronarien und Hirngefäßen, aber auch auf die glatte Muskulatur von Bronchien, Darm, der Gallenwege, der Spinkteren und der ableitenden Harnwege. Angewendet wird Papaverin in der Regel in der wasserlöslichen Hydrochlorid-Form. Aufgrund seiner chemischen Struktur ist Papaverin darüber hinaus lipophil. Ursprünglich wurde Papaverin als Spasmolytikum im Bereich des Magen-Darm-Traktes, der Harnwege und der Bronchien eingesetzt. In diesen Bereichen wurde es jedoch mittlerweile von anderen Substanzen abgelöst ⁴². Heutzutage wird Papaverin in vielen verschiedenen Bereichen angewandt. Ein berühmtes Beispiel hierfür stellt die erektile Dysfunktion in der Urologie dar. Papaverin wird hierbei intracavernös appliziert und erbringt eine Erfolgsquote von bis zu 80% ⁵⁷. Auch in der Herzchirurgie gehört die Anwendung von Papaverin heute zu den Standardverfahren. Bei Bypassoperationen werden die entnommenen Gefäße mit Hilfe von Papaverin-Lösungen dilatiert, um der Entstehung arterieller Spasmen vorzubeugen ³⁶. Selbstverständlich wurde und wird Papaverin aufgrund seiner hochpotenten vasodilatatorischen Eigenschaften auch in der Neurochirurgie zur Behandlung zerebraler Vasospasmen eingesetzt. Dies ist jedoch nicht ganz unproblematisch und gilt heutzutage zusammen mit der intraluminalen Ballondilatation als Mittel der letzten Wahl ^{28,88}. Zum einen liegt dies an der kurzen Halbwertszeit von Papaverin von 1 Stunde, was eine häufige intra-arterielle Gabe nötig macht, und darüber hinaus schädigt Papaverin durch seinen basischen pH-Wert das Endothel der Gefäße ^{4,189}. Das größte Problem in der intrazerebralen Anwendung liegt jedoch in dem schlagartigen Anstieg des Hirndruckes durch die plötzliche Dilatation der zerebralen Gefäße. Dies führt zu vorübergehenden neurologischen Defiziten, Mydriasis und bei vertebrobasilarer Anwendung zu einer Beeinflussung der Atmung. Aus all den oben genannten Gründen sollte Papaverin bei den vorzunehmenden Untersuchungen auf eine andere Art eingesetzt werden. Die Grundidee war die gleiche wie bei den oben geschilderten Versuchen mit CO₂. Sollten die Gefäße nach einer SAB enger sein als bei gesunden Tieren – was Ausdruck eines Spasmus wäre – ,so müssten die Gefäße bei einer ma-

ximalen Dilatation um einen größeren Prozentsatz dilatieren als dies bei gesunden Gefäßen der Fall wäre. Also musste mit Papaverin eine maximale Dilatation der zerebralen Gefäße erreicht werden, ohne den systemischen Blutdruck des Tieres zu stark zu ändern, weil eine Veränderung des Blutdruckes eine zuverlässige Beobachtung und anschließenden Vergleich zwischen Tieren mit SAB und gesunden Tieren unmöglich gemacht hätte. Somit kam einzig eine topische Papaverinapplikation in Frage. Zunächst wurden jeweils sechs Tiere mit ähnlichem Gewicht und Alter in zwei Gruppen eingeteilt. Anschließend wurde bei den Tieren einer Gruppe eine SAB nach 2.2.5. induziert (genannt „SAB“) und eine andere Gruppe als Kontrolle (genannt „Kontrolle“) nicht operiert.

Hiernach wurden, wie bereits bei den CO₂-Versuchen geschildert, die Tiere unter das Intravitalmikroskop gelegt und pro Tier jeweils drei Äste der Arteria cerebri media aufgesucht und diese mit jeweils 15 Minuten Abstand beobachtet und aufgezeichnet, um eine stabile Baseline zu erhalten. Anschließend wurde eine 100 µM Papaverin-Hydrochlorid Lösung (Papaverin-HCL, Sigma Chemicals, Deisenhofen, Deutschland) mit Hilfe einer Insulin-Nadel der Größe 30 Gauge (Sterican, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) jeweils einmal links und rechts neben die untersuchten Gefäße unter Sicht in den Subarachnoidalraum injiziert. Fünf Minuten nach Applikation wurden die entsprechenden Gefäße erneut unter dem Intravitalmikroskop aufgesucht und aufgezeichnet und dies noch zweimal mit 15 Minuten Abstand wiederholt. Die aufgezeichneten Bilder wurden nach Abschluss der Versuche ausgewertet.

2.2.9.5. Strahler-Schema

Bis heute gibt es keine genaue Beschreibung der charakteristischen Größen der pialen Mikrozirkulation der C57/Bl6 Maus. Dies erschwert in einem großen Maß die Bewertung, ob ein beobachtetes Gefäß einen normalen oder einen veränderten Gefäßdurchmesser hat. Aus diesem Grund war es erforderlich, die Gefäßigenschaften der beobachteten Region genau zu quantifizieren. Hierzu fand sich in der Literatur ein von Strahler et. al. 1944 entwickeltes System der Geomorphologie, um Täler- und Flußsysteme zu quantifizieren¹⁸⁰. Dieses System wurde in den Biowissenschaften schon häufiger benutzt, um dendritische Systeme wie beispielsweise neuronale Netzwerke oder Kapillarsysteme, aber auch Bronchialverzweigungen zu charakterisieren^{81,103,133,185,188}. Wir veränderten dieses System entsprechend für unsere Bedürfnisse und führten es folgendermaßen aus: Kapillaren wurde die Gefäßkategorie 0 zugewiesen. Sobald zwei Kapillaren konfluieren, hat das daraus entstehende Gefäß die Kategorie 1. Zwei Konfluierende Gefäße der Kategorie 1 bilden ein Gefäß der Kategorie 2 usw. Sollten zwei Gefäße unterschiedlicher Kategorien konfluieren, so bilden sie zusammen ein Gefäß der nächsthöchsten Kategorie. So bilden ein Gefäß der Kategorie 1 und ein Gefäß der Kategorie 2 beispielsweise ein Gefäß der Kategorie 3

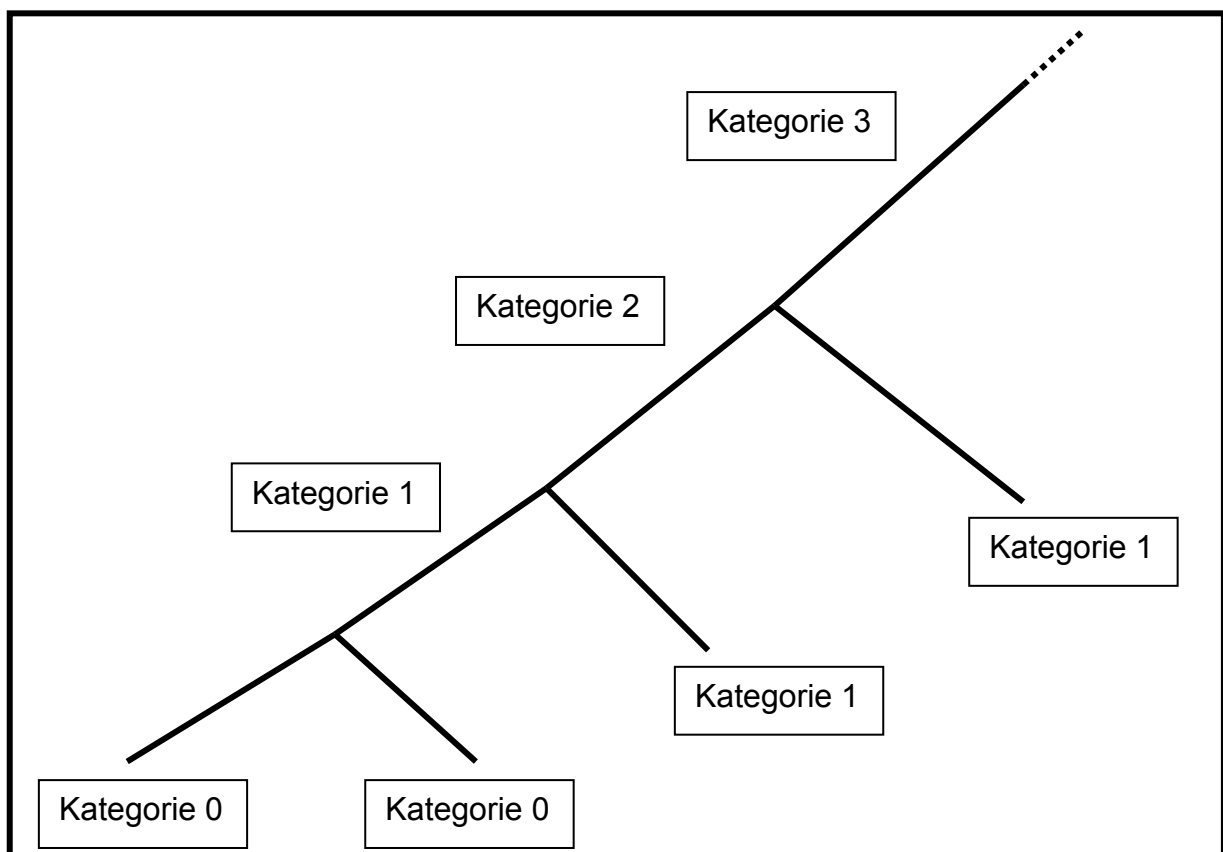


Abbildung 10. Schematische Darstellung des Strahler-Ordnungsschemas

rie 3. Nach diesem System wurden alle beobachteten Gefäße kategorisiert und im Folgenden ihr Durchmesser bestimmt. Zunächst wurden zwei Gruppen von jeweils sechs Tieren mit ähnlichem Gewicht und Alter gebildet. Bei der einen Gruppe wurde nach 2.2.5. eine SAB induziert und ihr Gefäßsystem drei Stunden hiernach charakterisiert (genannt „3h SAB“). Die Tiere der zweiten Gruppe wurden nicht operiert und somit die Eigenschaften der pialen Mikrozirkulation gesunder Tiere quantifiziert (genannt „Kontrolle“). Anschließend wurden die Tiere wie unter 2.2.8. beschrieben für die Intravitalmikroskopie präpariert, unter das Intravitalmikroskop gelegt und die Äste der Arteria cerebri media wie unter 2.2.9. beschrieben aufgesucht. Ihre Äste wurden in die Peripherie verfolgt bis sie sich zu Kapillaren ausgedünnt hatten. Von diesen ausgehend wurde dann das Strahler-System wie oben erklärt angewandt. Jeweils an Gabelungen wurde eine Aufnahme angefertigt und notiert, um welche Kategorie von Gefäßen es sich hierbei handelt. Auf diese Art und Weise standen somit pro Gefäß zwei Messwerte – vom Anfang und Ende des Gefäßes – zur Verfügung. Dies wurde für sämtliche Arterien in der untersuchten Region durchgeführt und die so entstandenen Bilder nach Ende der Versuche ausgewertet.

2.2.10. Hemmung der Thrombozytenaggregation

2.2.10.1. Vorversuche

Um die Auswirkungen der Thrombenentstehung auf die intraoperativen Daten, die Mortalität und die Morbidität nach SAB zu untersuchen, wurde den Tieren Tirofiban intraperitoneal appliziert. Tirofiban ist ein starker Inhibitor der Thrombozytenaggregation. Es ist ein Sulfonamid und wirkt als kompetitiver Inhibitor des Glykoprotein-IIa/IIIb-Rezeptors auf der Thrombozytenoberfläche. Dieser Rezeptor besitzt eine Schlüsselstelle in der Aggregation von Thrombozyten¹⁶⁵. In Vorversuchen wurde untersucht, ob die gewählte Dosis von 0,36 µg/g KG intraperitoneal (i.p.) appliziert zu verschiedenen Zeitpunkten zu einer signifikanten Reduktion der Thrombozytenaggregation führt. Zu diesem Zweck wurde den Tieren eine gewichtsadaptierte Dosis von Tirofiban i.p. appliziert und nach 15, 45, 60, 120 Minuten sowie nach 24 Stunden die Blutungszeit bestimmt. Hierfür wurde nach dem entsprechenden Zeitraum das Schwanzende um 6 mm abgeschnitten. Direkt hiernach wurde der Schwanzstumpf in ein Gefäß mit 0,9%iger NaCl-Lösung gehalten und die Zeit gestoppt, bis der aus dem Stumpf austretende Blutfaden abriß. Nach 30 Minuten wurde die Messung der Blutungszeit abgebrochen, falls bis dahin keine suffiziente Blutstillung eingetreten war.

2.2.10.2. Intraoperative Parameter und neurologische Funktion

12 Tiere wurden verblindet und randomisiert zwei Versuchsgruppen zugeordnet. Die erste Versuchsgruppe erhielt 0,36 µg/g KG Tirofiban i.p. 15 Minuten, eine, zwei, vier und 24 Stunden nach Induktion der SAB wie unter 2.2.5. beschrieben. Die zweite Gruppe erhielt eine in Bezug auf das applizierte Volumen identische Dosis 0,9%iger NaCl-Lösung i.p. 15 Minuten, eine, zwei, vier und 24 Stunden nach Induktion der SAB wie unter 2.2.5. beschrieben. Der ICP wurde wie unter 2.2.5. beschrieben für eine Stunde nach SAB gemessen und aufgezeichnet. Zusätzlich wurde die zerebrale Durchblutung mit Hilfe der Laser-Doppler-Fluxmetrie bestimmt. Hierzu wurde der linke Musculus temporalis nach Inzision der Kopfhaut stumpf abpräpariert, eine Glasfasersonde (MT B500-0, Perimed, Stockholm, Schweden) über dem Stromgebiet der Arteria cerebri media angebracht und mit einem Zweikomponentenkleber fixiert (Cyanoacrylate „Maxi-Cure“, Plastruct, City of Industry, Californien, USA; Härter: Accelerator „Insta-Set“, City of Industry, Californien, USA). Die Glasfasersonden wurden mit einer Laser-Doppler-Meßsonde (Probe 418/1, Perimed, Stockholm, Schweden) verbunden und diese anschließend an das Laser-Doppler-Gerät (Periflux 4001 Master, Perimed, Stockholm, Schweden) angeschlossen. Die Durchblutungswerte werden mit dieser Technik als Prozentwert der Ausgangsdurchblutung gemessen. Diese Durchblutungswerte wurden während der operativen Induktion der SAB und für eine Stunde danach gemessen und aufgezeichnet. Nach Beendigung des Beobachtungszeitraumes wurde die Anästhesie wie unter 2.2.5. beschrieben antagonisiert und die Tiere für 24 Stunden in einem Inkubator bei 36°C und 25% Luftfeuchtigkeit gelagert. Die Tiere wurden die nächsten 7 Tage beobachtet und ihre Mortalität bestimmt sowie täglich ihr Gewicht gemessen.

2.2.11. Versuchsgruppen

Folgende Versuchsgruppen wurden zur Untersuchung der Veränderungen der pialen Mikrozirkulation nach Subarachnoidalblutung gebildet:

- a. Sechs Tiere, deren Gewichtsverlauf und Überleben nach SAB sieben Tage lang beobachtet wurde.
- b. Sechs Tiere, deren Gewichtsverlauf und Überleben nach SAB mit zusätzlicher subkutaner Applikation eines Antibiotikums sieben Tage lang beobachtet wurde.

- c. Sechs gesunde Tiere, die abwechselnd Normo-/Hyper-/Normo-/Hypoventiliert wurden und deren Gefäßdurchmesser bestimmt wurde.
- d. Sechs Tiere drei Stunden nach SAB, die abwechselnd Normo-/Hyper-/Normo-/Hypoventiliert wurden und deren Gefäßdurchmesser bestimmt wurde.
- e. Sechs Tiere 24 Stunden nach SAB, die abwechselnd Normo-/Hyper-/Normo-/Hypoventiliert wurden und der Durchmesser ihrer Gefäße bestimmt wurde.
- f. Sechs gesunde Tiere, deren Gefäßdurchmesser während Baseline und nach der Beatmung mit 10%igen CO₂ bestimmt wurde.
- g. Sechs Tiere drei Stunden nach SAB, deren Gefäßdurchmesser während Baseline und nach der Beatmung mit 10%igen CO₂ bestimmt wurde.
- h. Sechs Tiere 24 Stunden nach SAB, deren Gefäßdurchmesser während Baseline und nach der Beatmung mit 10%igen CO₂ bestimmt wurde.
- i. Sechs gesunde Tiere, deren Reaktion bzgl. des Gefäßdurchmessers auf die lokale Applikation einer 100 µM Papaverin-HCL Lösung untersucht wurde.
- j. Sechs Tiere drei Stunden nach SAB, deren Reaktion bzgl. des Gefäßdurchmessers auf die lokale Applikation einer 100 µM Papaverin-HCL Lösung untersucht wurde.
- k. Sechs gesunde Tiere, deren komplette piaie Mikrozirkulation mit Hilfe des Strahler-Schemas charakterisiert wurde.
- l. Sechs Tiere drei Stunden nach SAB, deren komplette piaie Mikrozirkulation mit Hilfe des Strahler-Schemas charakterisiert wurde.
- m. Sechs Tiere, welche 0,36 µg/g KG Tirofiban i.p. appliziert bekamen und deren intraoperative Parameter sowie deren Mortalität und das Outcome bestimmt wurde.
- n. Sechs Tiere, welche eine volumenadaptierte Dosis 0,9%iger NaCl-Lösung i.p. appliziert bekamen und deren intraoperative Parameter sowie deren Mortalität und das Outcome bestimmt wurde.

2.2.12. Statistik

Zur Beurteilung der Daten wurden Varianzanalysen für unverbundene Stichproben durchgeführt. Die Nullhypothese, d.h. kein statistisch nachweisbarer Unterschied der untersuchten Daten, wurde mit einer Fehlerwahrscheinlichkeit von unter 5% abgelehnt. Die physiologischen Parameter und Gefäßdurchmesser wurden mit einer one-way ANOVA on Ranks, die ICP-Werte mit der two-way ANOVA on Ranks für wieder-

holte Messungen analysiert. Die Sterblichkeit der Gruppen wurde mit Hilfe des Chi-Quadrat-Tests verglichen. Die Statistik wurde mit Hilfe der Programme SigmaStat 3.0 (Systat Software, Erkrath, Deutschland) und Excel 2007 (Microsoft GmbH, Unterschleißheim, Deutschland) durchgeführt. Die Grafiken wurden mit Hilfe der Software SigmaPlot 10 (Systat Software, Erkrath, Deutschland) erstellt. Wenn nicht anders gekennzeichnet, sind in der Folge alle Daten als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes (SEM) angegeben.

3. Ergebnisse

3.1. Intrakranieller Druck

Vor der Perforation – wie unter 2.3.5. beschrieben - lag der Hirndruck für die Dauer der Operation konstant bei $3,6 \pm 0,1$ mmHg. Ungefähr 30 Minuten nach dem Beginn der Operation kam es durch Induktion der SAB zu einem sofortigen und steilen Anstieg des intrakraniellen Drucks auf $80,2 \pm 7,5$ mmHg (Abb. 10). Dies ist das deutliche Zeichen für die Induktion der SAB. Einzig eine Subarachnoidalblutung kann in dieser Situation einen solch drastischen Anstieg des ICP erklären. Der Anstieg des ICP stoppte, als der ICP den Wert des mittleren arteriellen Druckes (MAP) erreichte. Durch die nun beginnende Verteilung des Blutes im gesamten Subarachnoidalraum begann der ICP zu sinken. Zwei Minuten nach Induktion der SAB lag der ICP bei $42,1 \pm 5,8$ mmHg. Hiernach erholte sich der ICP in einem asymptotischen Verlauf, bis nach 60 Minuten schließlich ein stabiler Wert von $23 \pm 1,4$ mmHg erreicht wurde.

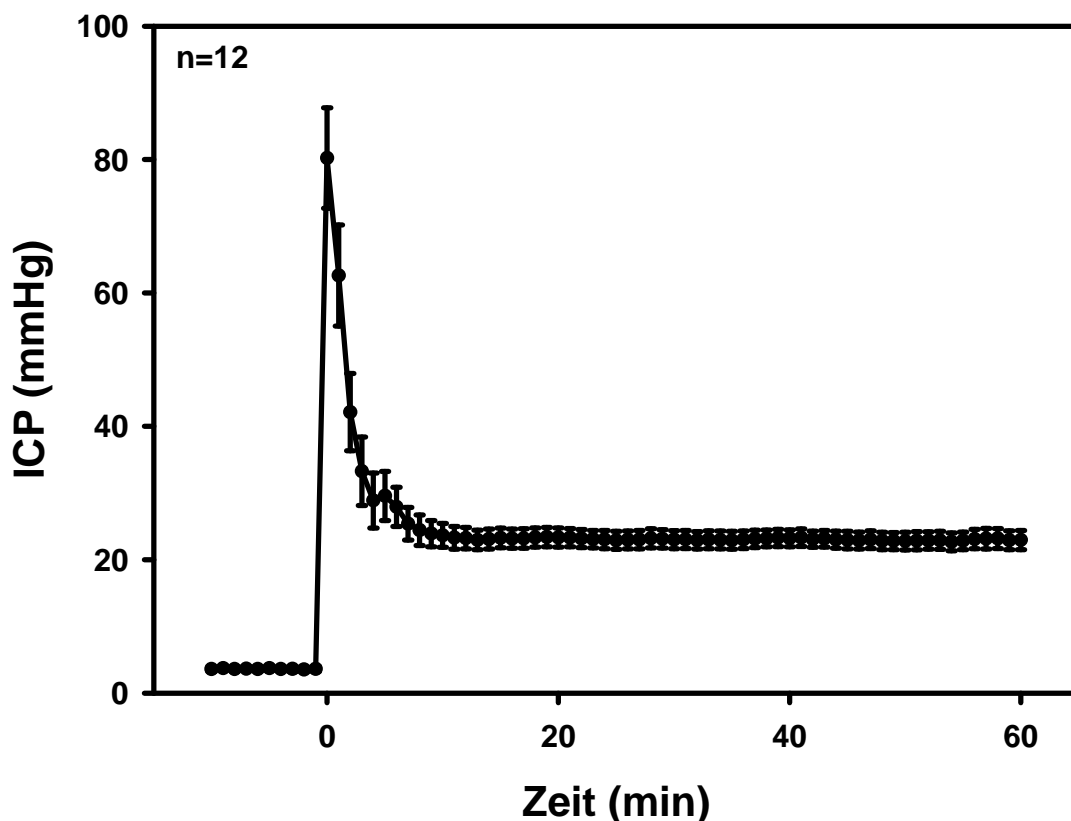


Abbildung 10. Zeitverlauf des Anstiegs des intrakraniellen Druckes bei der Induktion der SAB

3.2. Verteilung des Blutes im Subarachnoidalraum

3.2.1. Makroskopische Betrachtung der Blutverteilung

Die oben erwähnten Daten in Bezug auf den Hirndruck gaben einen deutlichen Hinweis auf die Induktion einer SAB. Um sicher zu gehen, daß dieser Anstieg des Hirn-

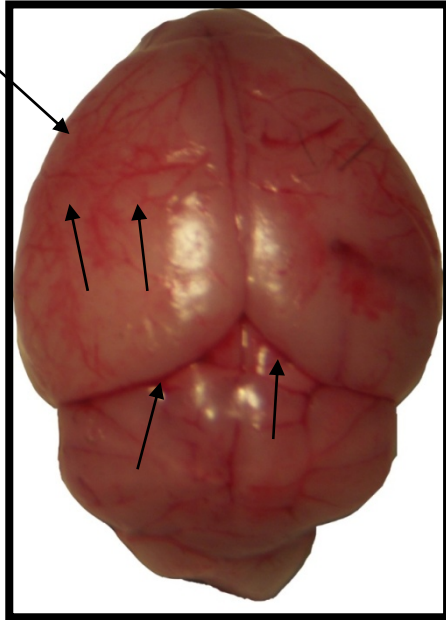


Abbildung 11. Parietale Oberfläche des Gehirns einer C57/Bl6 Maus nach SAB. Die Pfeile deuten auf Areale subarachnoidalen Blutes.

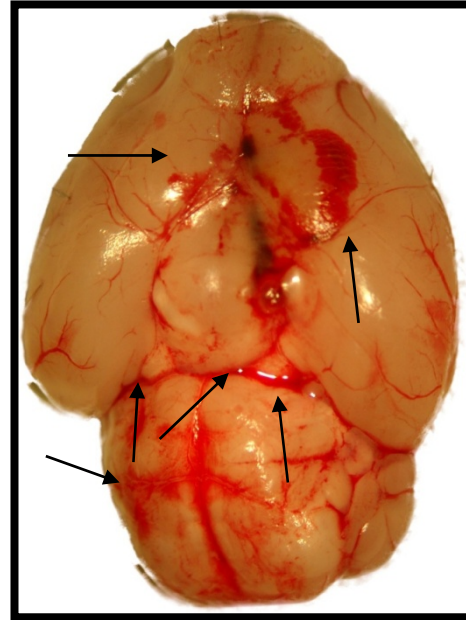


Abbildung 12. Makroskopische Verteilung des Blutes in den Subarachnoidalraum von unten betrachtet. Die Pfeile deuten auf makroskopisch sichtbare Blutansammlungen.

druckes auf eine Blutung in den Subarachnoidalraum zurückzuführen war, wurden die Gehirne der Tiere, die einer SAB unterzogen wurden, entnommen und unter einem Mikroskop untersucht. Es zeigten sich deutliche Spuren von Blut um die Gefäße und in den basalen Zisternen des Mäusegehirns (Abb. 11 + 12). Dieses war inhomogen verteilt, befand sich jedoch ganz deutlich um die Gefäße in der untersuchten Region und war somit, im Zusammenspiel mit den ICP-Daten, ein Beweis für eine erfolgreiche Induktion einer SAB.

3.2.2. Mikroskopische Betrachtung der Blutverteilung

Entsprechend der unter 2.2.8. beschriebenen Methode wurden die Tiere unter das Intravitalmikroskop gelegt, um zunächst eine Übersicht über die zu untersuchende Region mit dem 10x Objektiv zu gewinnen. Deutlich sind die von oben eintretenden Äste der Arteria cerebri media zu sehen und die nach unten in den Sinus sagittalis su-

terior drainierenden Venen (Abb. 18). Bei einem Vergleich der Übersichtsaufnahmen von gesunden Kontrolltieren mit denen nach einer induzierten SAB, fällt ganz deut-

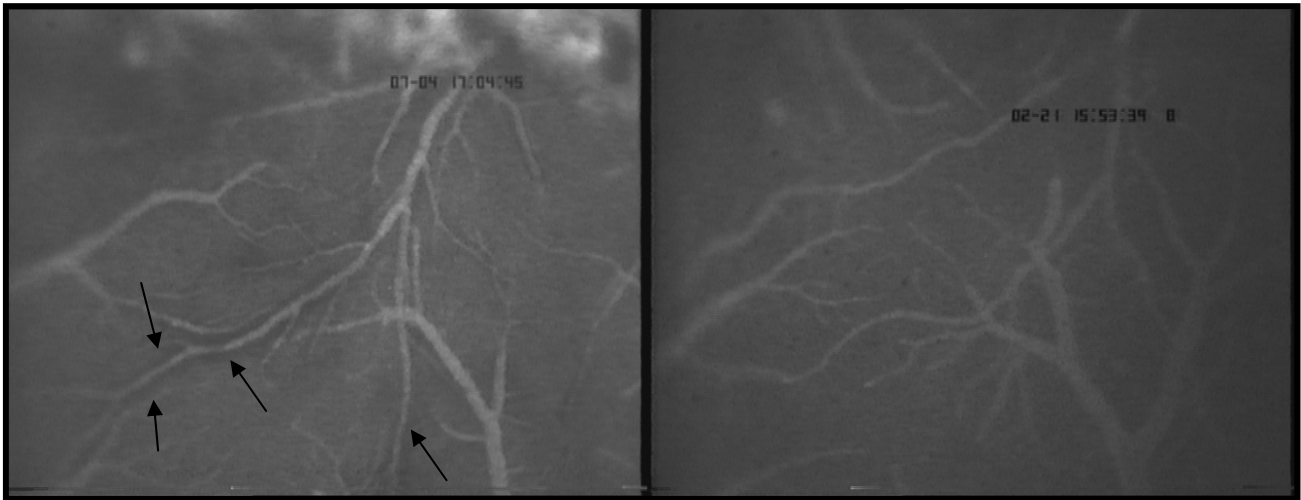


Abbildung 13. Übersichtsaufnahme des Versorgungsgebiets der Arteria cerebri media mit Intravitalmikroskopie nach SAB (links) und in einem Kontrolltier (rechts). Die Pfeile deuten auf den schwarzen Randsaum um die Gefäße, welcher durch den Austritt des Blutes hervorgerufen wird. Bei gesunden Kontrolltieren (rechts) fehlt dieser Randsaum.

lich ein schwarzer Randsaum auf, welcher die Gefäße umrahmt (Abb. 13 links). Dieser Randsaum fehlt vollkommen bei gesunden Kontrolltieren (Abb. 13 rechts). Er ist ein Beweis für eine erfolgte SAB. Daraus schließen wir, dass es sich bei dem Randsaum um in den Subarachnoidalraum ausgetretenes Blut handelt. Da das Blut austrat, bevor es mit dem Farbstoff FITC-Dextran angefärbt wurde, fluoresziert es nicht und vermittelt somit den Eindruck eines schwarzen Randsaumes um die Gefäße. Somit ist auch mikroskopisch untermauert, was durch die ICP-Daten und die makroskopische Betrachtung der Gehirne bereits gezeigt wurde:

1. Das Modell löst zuverlässig eine Subarachnoidalblutung aus.
2. Obwohl die Blutung basal ausgelöst wurde, verteilt sich das Blut über die gesamte Hemisphäre und umgibt auch die Gefäße auf der Oberseite des Gehirns, d.h. im Beobachtungsfenster.

3.3. Outcome nach Subarachnoidalblutung

3.3.1. Letalität

In der Kontrollgruppe verstarben insgesamt 2 von 6 Tieren innerhalb von sieben Tagen nach Induktion der SAB, was einer Mortalität von 33,3% entspricht. Innerhalb der ersten 24 Stunden verstarb hierbei ein Tier (16,6%), ein weiteres verstarb am Tag fünf nach der Induktion der SAB. Nach der SAB-OP und einer anschließenden Behandlung mit 1ml/kg KG 2,5%igem Enrofloxacin s.c. alle 24 Stunden verstarben insgesamt 3 von 6 Tieren, was einer Mortalität von 50% entspricht. Hierbei verstarben innerhalb der ersten 24 Stunden 2 Tiere (33,3%), und ein weiteres verstarb am fünften Tag. Es fand sich kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen der unbehandelten Kontrollgruppe und der Versuchsgruppe, welche das Antibiotikum verabreicht bekam ($p=0,55$) (Abb. 14).

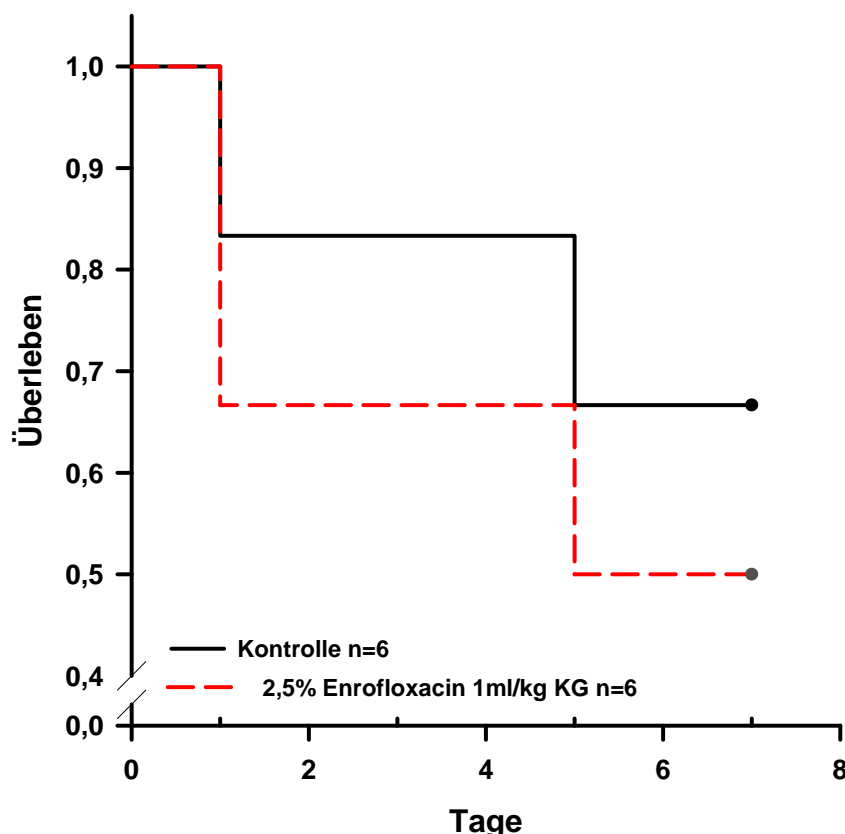


Abbildung 14. Kumuliertes Überleben nach Subarachnoidalblutung Kontrolle vs. Antibiose (Kaplan-Meier-Kurve)

3.3.2. Gewichtsverlauf

Zur Ermittlung des Gewichtsverlaufes wurden nur die Tiere herangezogen, welche die vollen sieben Tage nach SAB-OP überlebt haben. Dies waren - wie unter 3.3.1. erwähnt - in der Kontrollgruppe, welche nach der SAB nicht nachbehandelt wurde vier Tiere und in der Gruppe, welche postoperativ Antibiotika erhielt, drei Tiere. Die Tiere in der Kontrollgruppe hatten vor der SAB ein Gewicht von $23,2 \pm 0,2$ g. Innerhalb der ersten drei Tage nach SAB zeigt sich eine deutliche Gewichtsreduktion auf $20,5 \pm 0,1$ g an Tag 1, $19,6 \pm 0,4$ g an Tag 2 und $19,3 \pm 0,5$ g an Tag 3. Hiernach erholte sich das Gewicht langsam wieder und erreichte nach sieben Tagen einen Wert von $21,2 \pm 0,6$ g. Die Tiere in der Antibiotika-Gruppe hatten vor der SAB ein Gewicht von $23,3 \pm 0,3$ g.

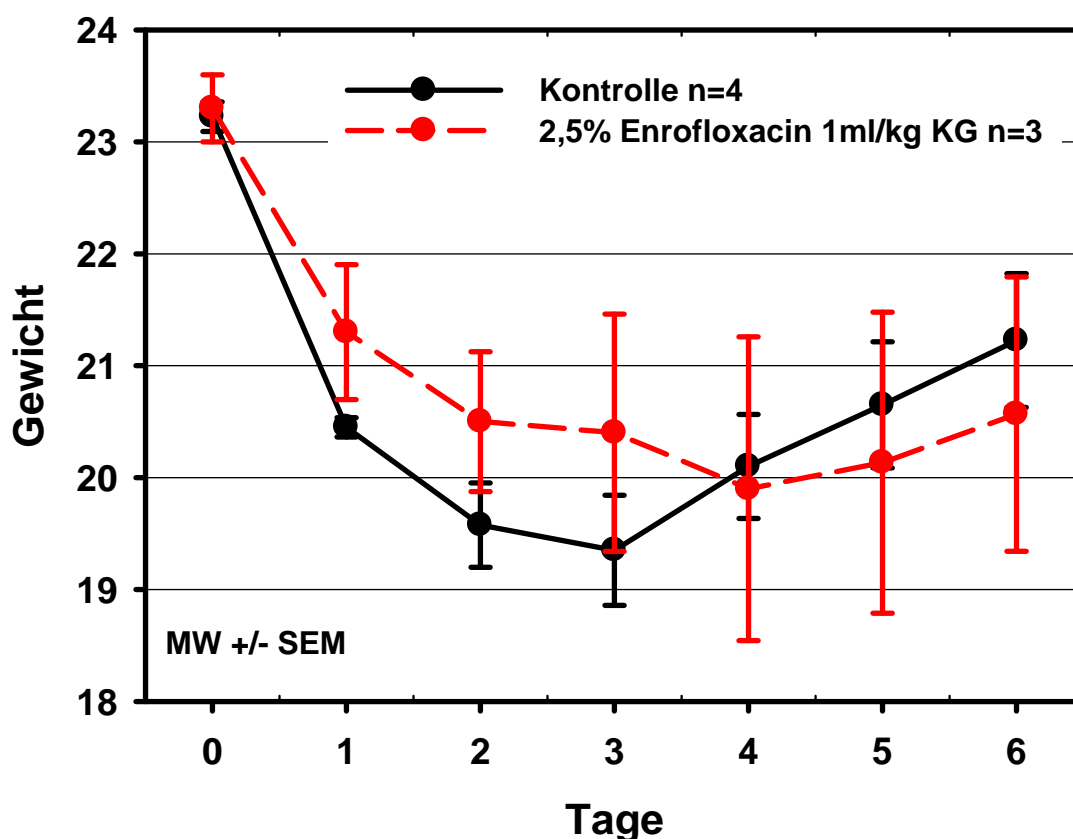


Abbildung 15. Gewichtsverlauf sechs Tage nach Subarachnoidalblutung Kontrolle vs. Antibiose

Auch diese Tiere hatten nach der SAB einen deutlichen Gewichtsverlust, erreichten ihren Nadir jedoch an Tag 4 mit einem Gewicht von $19,9 \pm 1,3$ g. Sieben Tage nach SAB hatten die Tiere wieder ein Gewicht von $20,6 \pm 1,2$ g erreicht. Zu keinem Zeitpunkt zeigt sich ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen der Kontrollgruppe und der Gruppe, welche nach SAB mit Antibiotika behandelt wurde (Abb. 15).

3.4. Beatmung mit verschiedenen Frequenzen

Bei Kontrolltieren, bei denen keine SAB induziert wurde, lag der relative Gefäßdurchmesser der Arteriolen während der initialen, 10-minütigen Phase der Normoventilation bei $102 \pm 1\%$. Nach Hyperventilation kontrahierten sich die pialen Widerstandsgefäße nach fünf Minuten auf $87 \pm 4\%$ und erreichten nach weiteren fünf Minuten der Hyperventilation einen Durchmesser von $86 \pm 3\%$.

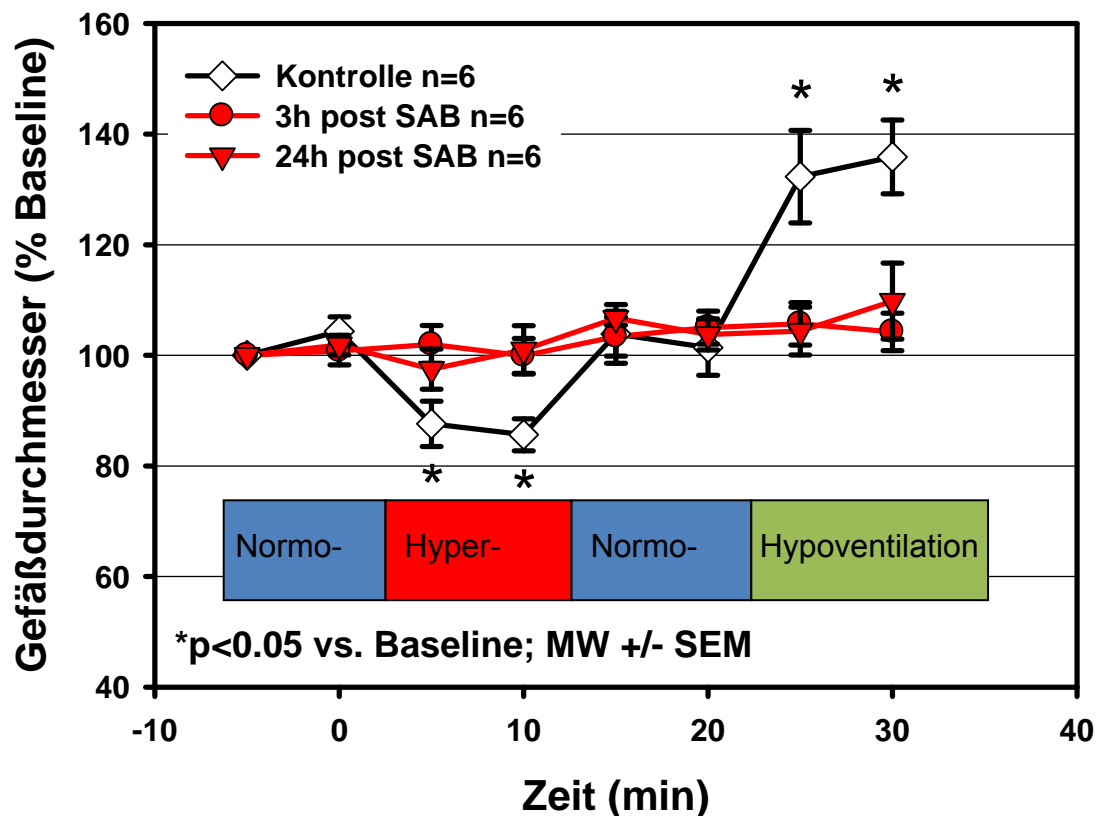


Abbildung 16. Verlauf des Gefäßdurchmessers der Arteriolen in % Baseline während nacheinander folgender Normo-/Hyper-/Normo-/Hypoventilation in Kontrolltieren, drei Stunden und 24 Stunden nach SAB.

Somit war nach Hyperventilation eine signifikante Abnahme des Gefäßdurchmessers bei Kontrolltieren zu verzeichnen. Nach erneuter Normoventilation entspannten sich die Gefäße und kehrten zu einem Durchmesser von $103 \pm 3\%$ zurück. Die darauffolgende Hypoventilation führte zu einer deutlichen und signifikanten Dilatation der Gefäße auf $132 \pm 8\%$ nach fünf Minuten Hypoventilation und auf $136 \pm 7\%$ nach zehn Minuten (Abb. 16 + 17). Der arterielle Kohlendioxidpartialdruck verhielt sich wie erwartet, indem er nach Hyperventilation deutlich sank und bei Hypoventilation entsprechend anstieg (Tab. 1).

	Kontrolle	3h SAB	24h SAB
Normoventilation	39 ± 3 mmHg	38 ± 2 mmHg	39 ± 4 mmHg
Hyperventilation	22 ± 2 mmHg	23 ± 3 mmHg	23 ± 5 mmHg
Normoventilation	38 ± 4 mmHg	39 ± 2 mmHg	37 ± 3 mmHg
Hypoventilation	49 ± 2 mmHg	47 ± 4 mmHg	51 ± 3 mmHg

Tab. 1: Arterieller Kohlendioxidpartialdruck bei verschiedenen Beatmungsfrequenzen

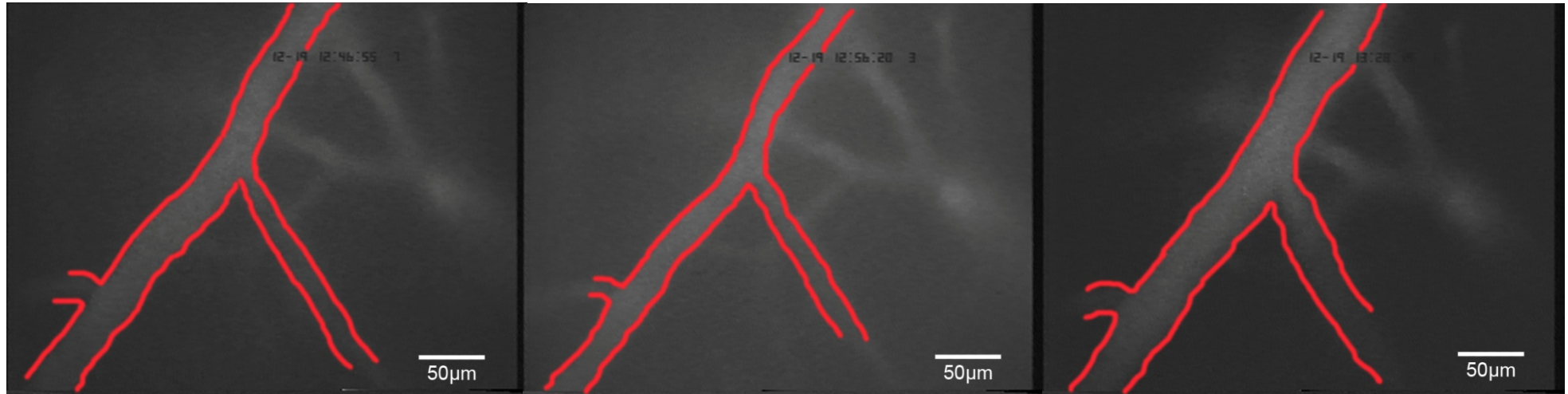
Die Tiere, bei welchen 3 Stunden vor Beginn der Ventilationsversuche eine SAB induziert wurde, hatten während der zehn Minuten Normoventilation einen Gefäßdurchmesser von $100 \pm 1\%$. Nachdem diese Tiere hyperventiliert wurden, blieb ihr Gefäßdurchmesser bei $102 \pm 3\%$ nach fünf Minuten und $100 \pm 3\%$ nach zehn Minuten. Die anschließenden zehn Minuten Hypoventilation änderten ebenfalls nichts am bestehenden Gefäßdurchmesser der Widerstandsgefäße. Nach fünf Minuten Hypoventilation betrug der Durchmesser $106 \pm 4\%$ und nach zehn Minuten $104 \pm 3\%$. Der arterielle CO_2 Partialdruck unterschied sich hierbei nicht von denen der Kontrolltiere (Tab. 1). Auch bei den Tieren, welche 24 Stunden nach Induktion der SAB untersucht wurden, zeigte sich ein ähnliches Bild: während der initialen Normoventilation blieb der Gefäßdurchmesser konstant bei $101 \pm 1\%$. Die anschließende Hyperventilation änderte den Durchmesser mit $97 \pm 4\%$ weder nach fünf Minuten noch mit $101 \pm 4\%$ nach zehn Minuten. Auch nach erneuter Normoventilation blieb der Gefäßdurchmesser bei $105 \pm 1\%$. Fünf Minuten nach Hypoventilation betrug der Durchmesser der untersuchten zerebralen Gefäße $104 \pm 4\%$ und zeigte auch weitere fünf Minuten später mit $110 \pm 7\%$ keine signifikante Änderung (Abb. 16 + 17). Auch in der Gruppe, welche 24 Stunden nach SAB untersucht wurde, gab es keine signifikanten Unterschiede des PaCO_2 im Vergleich zu der Kontrollgruppe (Tab. 1).

Normoventilation

Hyperventilation

Hypoventilation

Kontrolle



SAB

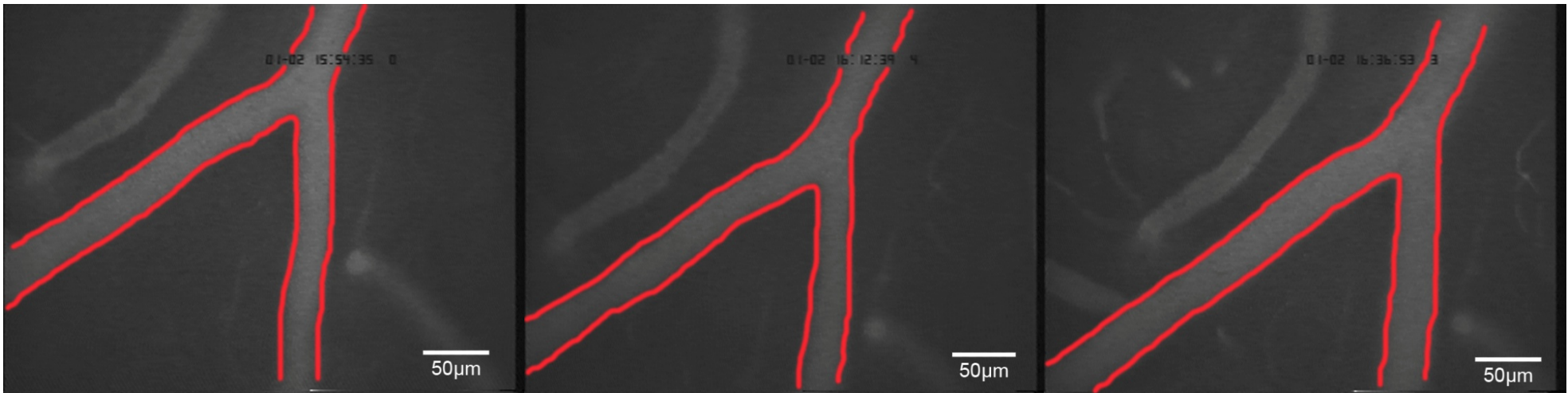


Abbildung 17. Exemplarische Abbildung des Verhaltens der zerebralen, pialen Widerstandsgefäße auf eine nacheinander folgende Normo-/Hyper-/Hypoventilation von links nach rechts in Kontrolltieren und 3h nach SAB.

3.5. Beatmen mit 10% Kohlendioxid

Nun stellte sich die Frage, wie die Gefäße auf eine PaCO₂-Konzentration jenseits aller physiologisch erreichbaren Werte reagieren würden. Zu diesem Zweck wurden die pialen Gefäße von Kontrolltieren - wie unter 2.2.9.3. beschrieben - zunächst für eine halbe Stunde beobachtet, um einen stabilen Ausgangswert zu erhalten. Nach 15 Minuten betrug der Gefäßdurchmesser 109 ± 4% und weitere 15 Minuten später war er weiterhin stabil bei 97 ± 4%. Hiernach wurde die Maus mit einer Mischung aus 10% CO₂, 35% O₂ und 55% Raumluft beatmet. Die Gefäße der Kontrolltiere reagierten hierauf prompt und deutlich.

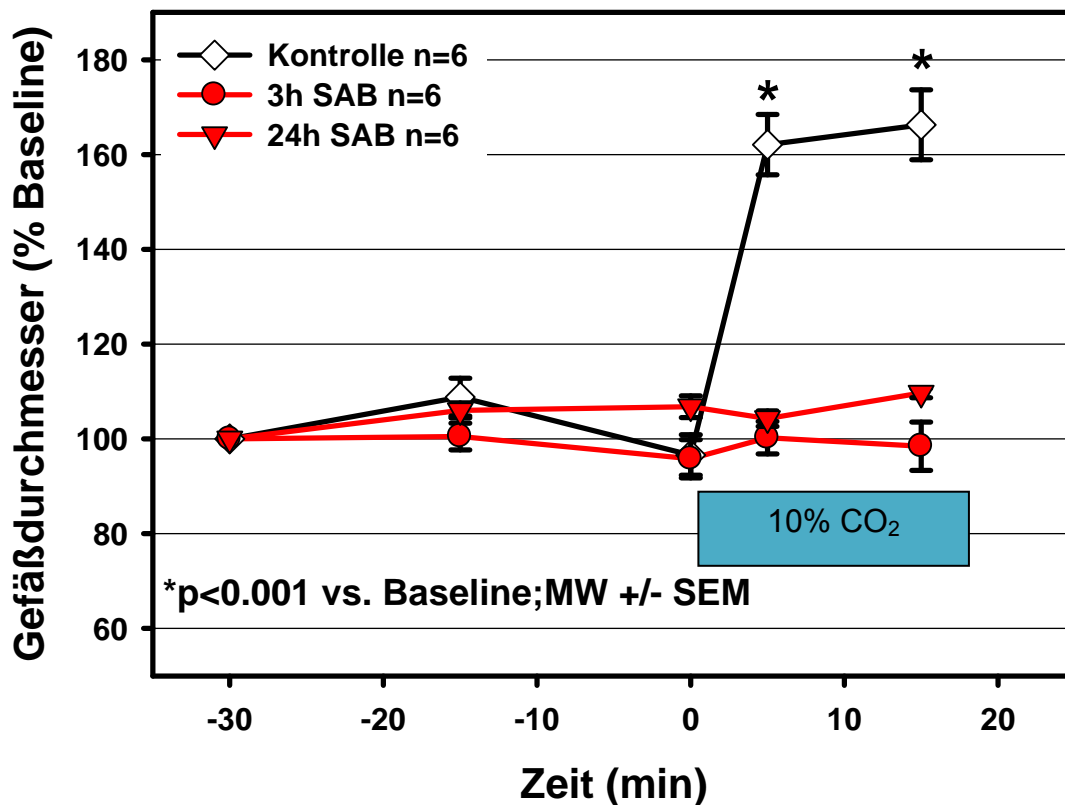


Abbildung 18. Verlauf des Gefäßdurchmessers in % Baseline vor und nach Inhalation von 10% CO₂ in Kontrolltieren, sowie drei Stunden und 24 Stunden nach SAB.

Fünf Minuten nach Beginn der Beatmung mit Kohlendioxid betrug der Gefäßdurchmesser 162 ± 6% und weitere zehn Minuten später 166 ± 7%. Dies war eine hochsignifikante Dilatation bezogen auf die Ausgangswerte (Abb. 18 + 19). Wie zu erwarten, stieg der PaCO₂ nach der Beatmung mit 10% Kohlendioxid deutlich an (Tab. 2).

	Kontrolle	3h SAB	24h SAB
Baseline	36 ± 4 mmHg	38 ± 3 mmHg	36 ± 5 mmHg
10% CO ₂	274 ± 11 mmHg	278 ± 12 mmHg	281 ± 15 mmHg

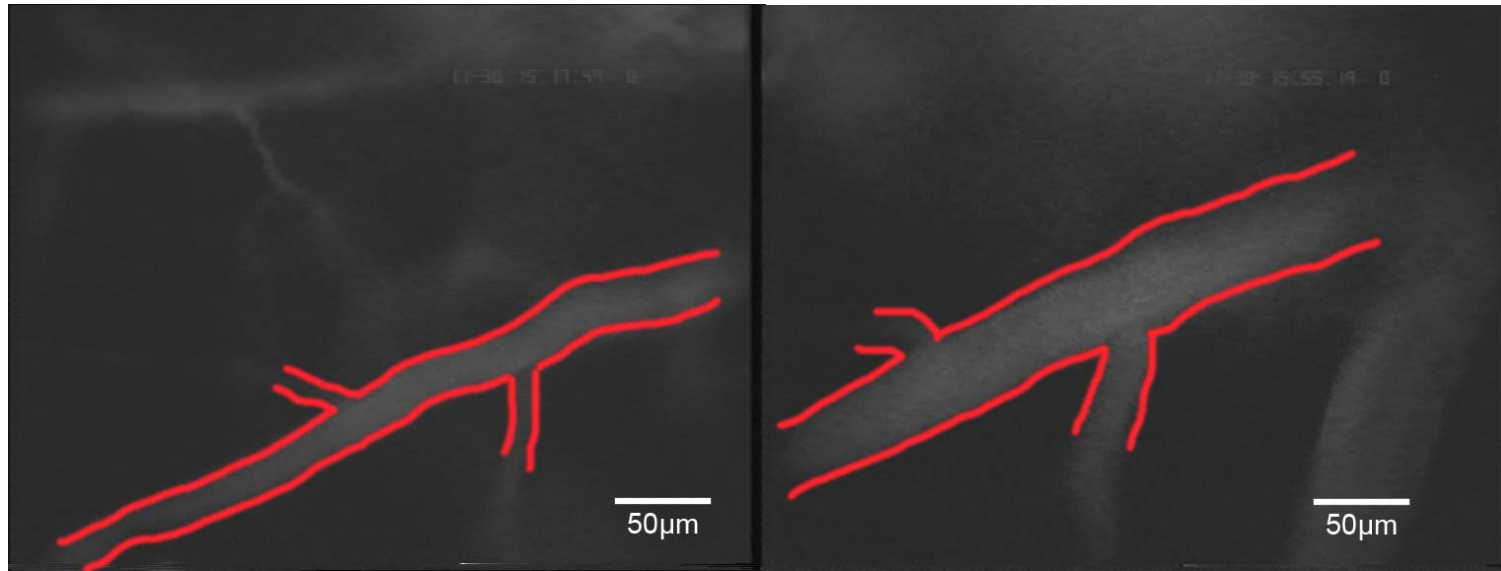
Tab. 2: Arterieller Kohlendioxidpartialdruck vor und nach Inhalation mit 10% CO₂

Die Tiere, die 3 Stunden nachdem bei ihnen eine SAB induziert wurde, untersucht wurden, zeigten in den 30 Minuten Baselinemessung einen ebenfalls konstanten Gefäßdurchmesser mit $100 \pm 3\%$ nach 15 Minuten und $96 \pm 4\%$ nach 30 Minuten. Erneut zeigte sich auch hier auf den Anstieg des PaCO₂ keine adäquate Reaktion der pialen Gefäße. Der Durchmesser betrug fünf Minuten nach Inhalation $100 \pm 3\%$ und weitere zehn Minuten später $98 \pm 5\%$ (Abb. 18 + 19). Der Anstieg des PaCO₂ war hierbei erneut nicht unterschiedlich verglichen mit den Kontrolltieren (Tab. 2). Auch bei den Tieren, welche 24 Stunden nach SAB näher untersucht wurden, zeigte sich ein ähnliches Bild. Während der Bestimmung des Ausgangswertes blieb der piale Gefäßdurchmesser konstant bei $106 \pm 2\%$ nach fünfzehn Minuten und $105 \pm 3\%$ nach 30 Minuten. Auf die Inhalation mit CO₂ reagierten auch diese Tiere nicht und hatten fünf Minuten nach Beginn der Inhalation einen Durchmesser von $104 \pm 2\%$ und weitere zehn Minuten später einen Durchmesser von $110 \pm 1\%$ (Abb. 23 + 24). Auch bei diesen Tieren zeigte die Blutgasanalyse einen gleichen Anstieg des PaCO₂ wie bei den Kontrolltieren (Tab. 2).

~ 0,05% CO₂

+ 10% CO₂

Kontrolle



3h SAB

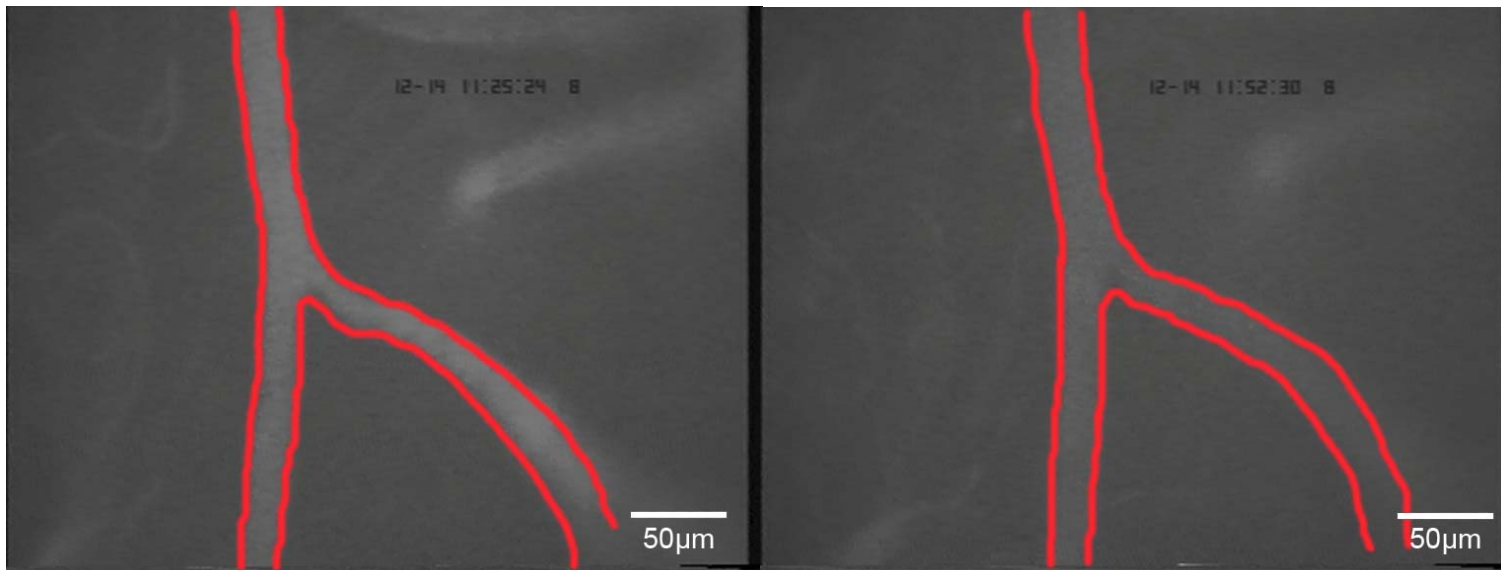


Abbildung 19. Exemplarische Darstellung des Verhaltens der zerebralen, pialen Widerstandsgefäße auf die Inhalation von 10% CO₂.

3.6. Anwendung von Papaverin

Die Versuche wurden wie unter 2.2.9.4. beschrieben durchgeführt. Kontrolltiere hielten über die 30 Minuten der Baselinemessung einen konstanten Gefäßdurchmesser von $96 \pm 3\%$ nach 15 Minuten und $96 \pm 3\%$ nach 30 Minuten. Nach der lokalen Applikation einer $100 \mu\text{M}$ Papaverin-Lösung in den Subarachnoidalraum in der unmittelbaren Nähe der untersuchten Gefäße dilatierten diese sofort signifikant auf $167 \pm 7\%$ nach 5 Minuten, $176 \pm 8\%$ nach 20 Minuten und $175 \pm 8\%$ nach 35 Minuten (Abb. 20).

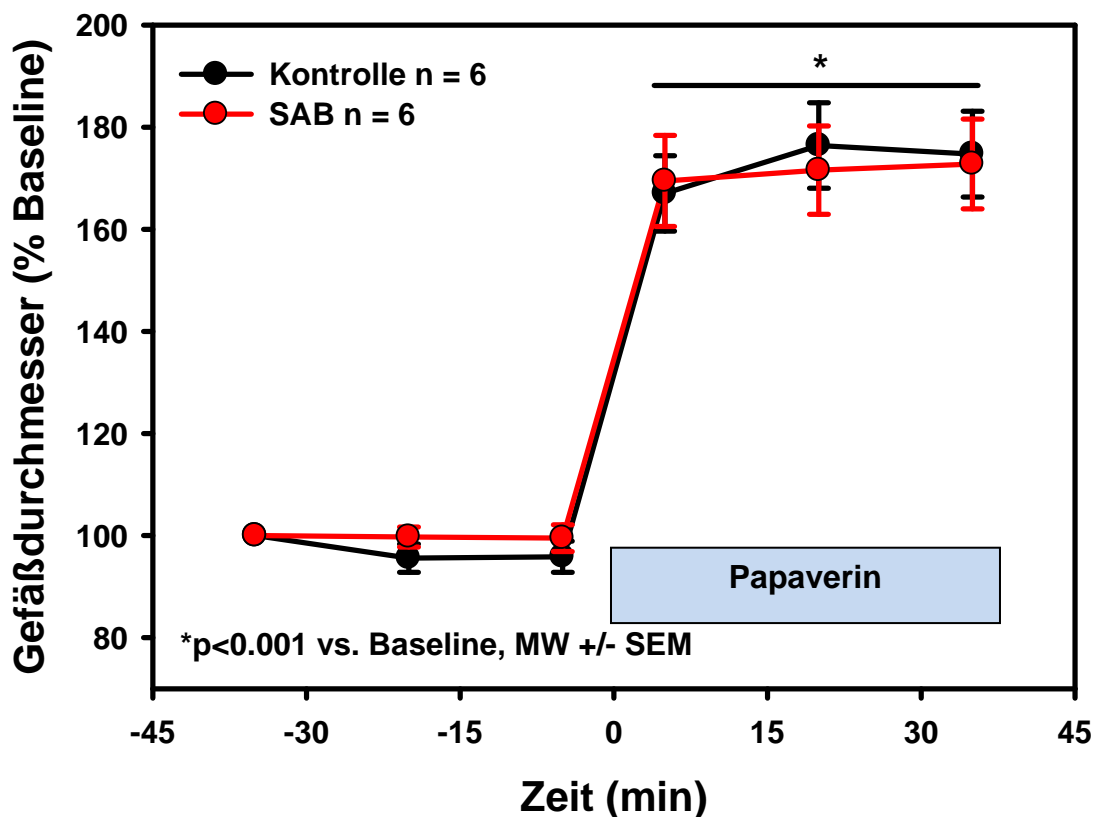


Abbildung 20. Verlauf des Gefäßdurchmessers in % Baseline vor und nach lokaler Applikation von $100\mu\text{M}$ Papaverin-Lösung in Kontrolltieren und nach SAB.

Die Mäuse 3 Stunden nach SAB verhielten sich auf die gleiche Art und Weise. Sie zeigten einen konstanten Gefäßdurchmesser während Baselinemessungen mit $100 \pm 2\%$ und $99 \pm 3\%$ nach 15 respektive 30 Minuten. Und auch hier dilatierten die Gefäße nach lokaler Applikation von Papaverin signifikant maximal auf $169 \pm 9\%$ nach fünf Minuten, $172 \pm 9\%$ nach 20 Minuten und $173 \pm 9\%$ nach 35 Minuten (Abb. 19).

Im Vergleich zwischen den Kontrolltieren und den Tieren, bei welchen eine SAB induziert wurde, zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Reaktion auf die lokale Applikation von 100 μM Papaverin in den Subarachnoidalraum.

3.7. Strahler-Schema

Um eine objektive Quantifizierung der Gefäßweite der pialen Mikrozirkulation der C57/Bl6 Maus zu erhalten, wurde die Gefäßarchitektur gesunder Kontrolltiere - wie unter 2.2.9.5. beschrieben - mit Hilfe des Strahler-Ordnungsschemas untersucht.

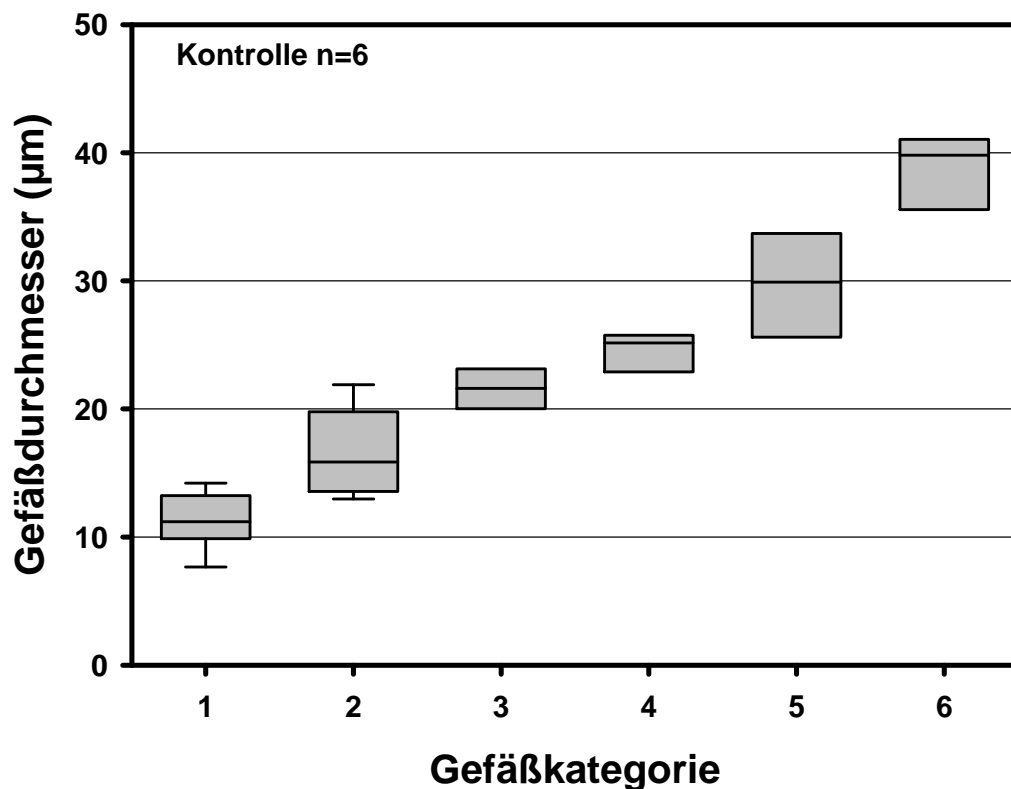


Abbildung 21. Boxplot der Gefäßgröße der einzelnen Gefäßkategorien von gesunden Kontrolltieren. Dargestellt sind der Median und das obere und untere Quartil. Die Balken zeigen die 10er und 90er Perzentile.

Gefäße der Kategorie 1 zeigten hierbei einen Durchmesser von $11,2 \pm 0,6 \mu\text{m}$, Kategorie 2 einen Durchmesser $16,5 \pm 0,9 \mu\text{m}$, Kategorie 3 einen Durchmesser von $21,9 \pm 0,8 \mu\text{m}$, Kategorie 4 einen Durchmesser von $24,4 \pm 0,8 \mu\text{m}$, Kategorie 5 einen

Durchmesser von $29,9 \pm 2,2 \mu\text{m}$ der und Kategorie 6 einen Durchmesser von $38,6 \pm 1,5 \mu\text{m}$ (Abb. 21).

Mit diesen Daten zur Architektur der zerebralen Mikrozirkulation gesunder C57/Bl6 Mäuse konnten nun erstmals die Daten nach SAB verglichen werden. 3 Stunden nach Induktion der SAB wurde das Strahler-Schema - wie unter 2.2.9.5. beschrieben - auf die Tiere angewandt und somit ihre gesamte Mikrozirkulation im Untersuchungsgebiet quantifiziert. Nach SAB zeigten sich folgende Werte: $11,1 \pm 0,5 \mu\text{m}$ für

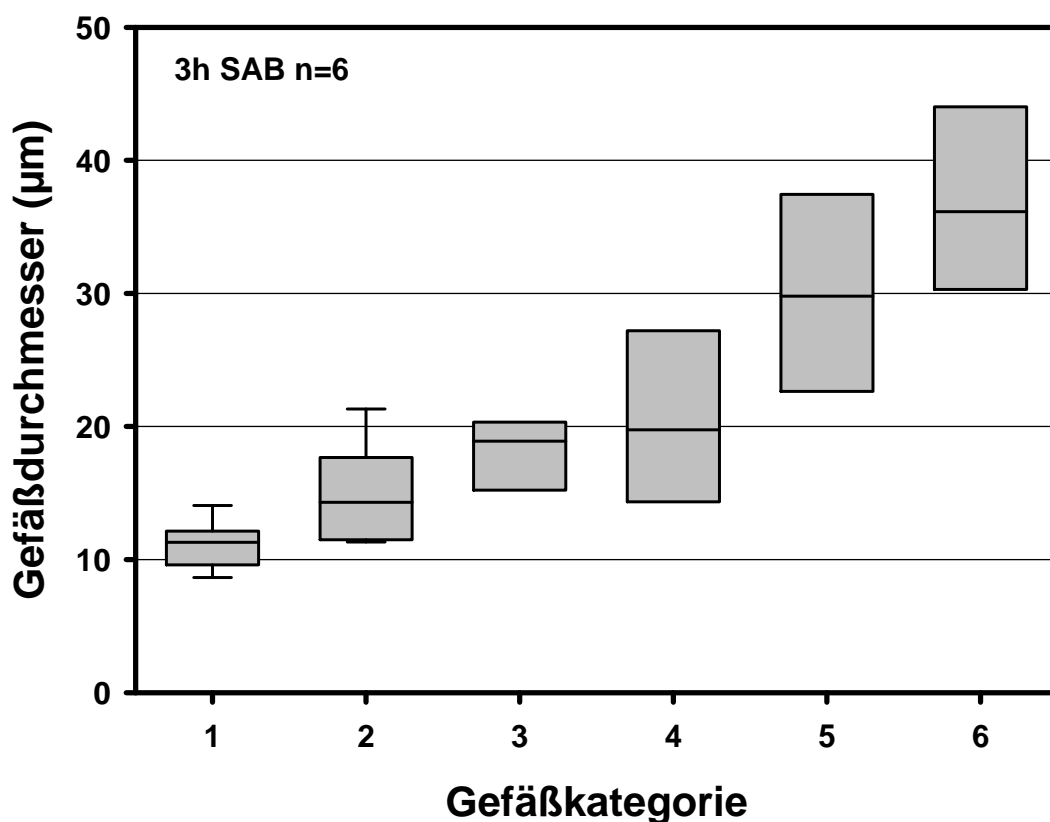


Abbildung 22. Boxplot der Gefäßgröße der einzelnen Gefäßkategorien von Tieren 3 Stunden nach SAB. Dargestellt sind der Median und das obere und untere Quartil. Die Balken zeigen die 10er und 90er Perzentile.

Kategorie 1, $14,8 \pm 1,1 \mu\text{m}$ für Kategorie 2, $18,3 \pm 1,1 \mu\text{m}$ für Kategorie 3, $21,6 \pm 3,7 \mu\text{m}$ für Kategorie 4, $30 \pm 3,6 \mu\text{m}$ für Kategorie 5 und $36,8 \pm 3,6 \mu\text{m}$ für Kategorie 6 (Abb. 22). Im Vergleich zwischen gesunden Kontrolltieren und Tieren 3 Stunden nach Induktion einer SAB zeigte sich bei den Tieren nach SAB als genereller Trend, daß die Gefäße eher stärker kontrahiert waren als dies bei den gesunden Kontrolltieren der Fall war. Dies traf besonders auf die Gefäße der Kategorien 2,3,4 und 6 zu.

Jedoch zeigten einzig die pialen Gefäße der Kategorie 3 einen signifikanten Unterschied zwischen den gesunden Kontrolltieren und solchen 3 Stunden nach Induktion einer SAB (Abb. 23).

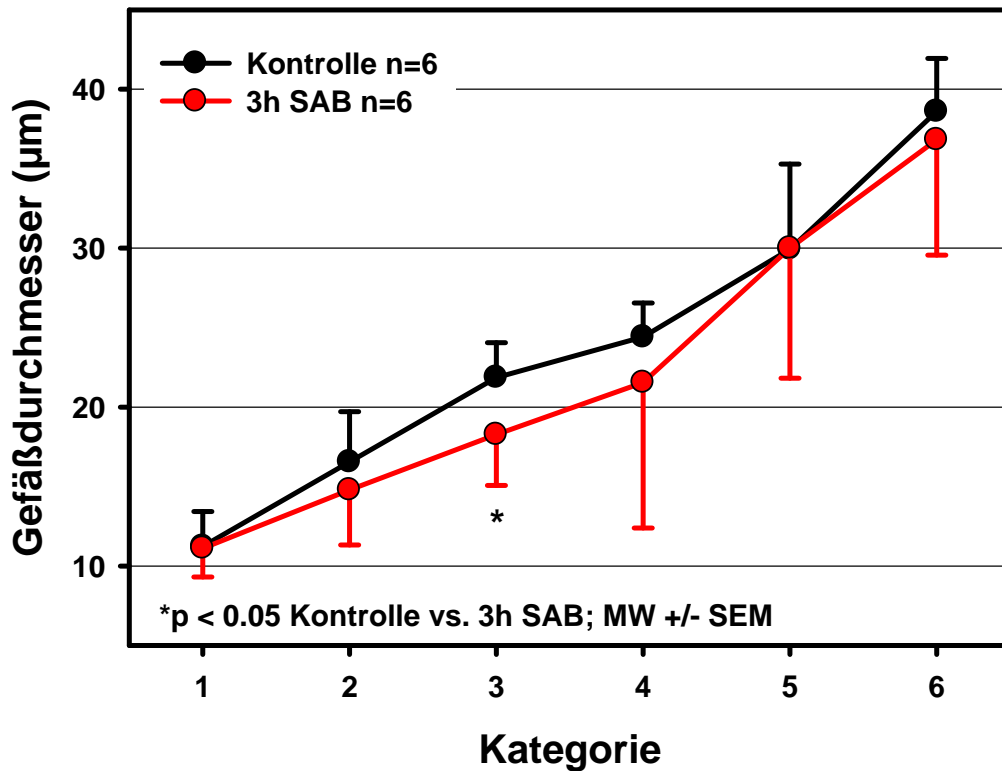


Abbildung 23. Darstellung des Gefäßdurchmessers der einzelnen Gefäßkategorien von gesunden Kontrolltieren verglichen mit Tieren 3 Stunden nach Induktion einer SAB.

3.8. Mikrovasospasmen

Im Rahmen der Versuche, welche unter 2.2.9.5. beschrieben wurden, fiel ein Phänomen auf, welches bis jetzt einzig von Uhl et. al. ¹⁸⁷ bei Menschen beschrieben wurde. Wenn man den Gefäßen bei der Erstellung des Strahler-Schemas entgegen der Flußrichtung von distal nach proximal folgte, fielen bei den Tieren, bei denen drei Stunden vor der Untersuchung eine SAB induziert wurde, deutliche Mikrovasospasmen in verschiedenen Formen auf: teils segmentale Mikrovasospasmen (Abb. 24) und teils Mikrovasospasmen in einem Pearl-and-String Muster (Abb. 25). Insgesamt wurden bei den sechs Tieren, bei denen drei Stunden zuvor eine SAB induziert wurde, an insgesamt 355 untersuchten Gefäßen 115 Mikrovasospasmen

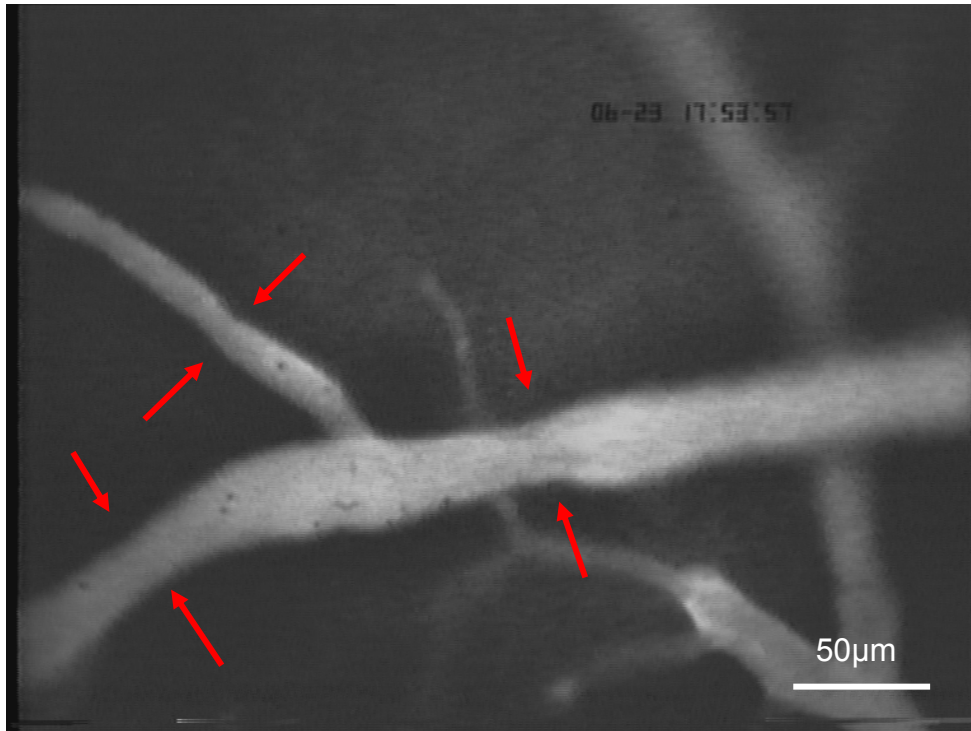


Abbildung 24. Exemplarische Darstellung einer Arteriole mit ihren deutlich sichtbaren segmentalen Mikrovasospasmen. Die Pfeile zeigen auf die Stellen mit der stärksten segmentalen Kontraktion. Aufgenommen drei Stunden nach Induktion der SAB

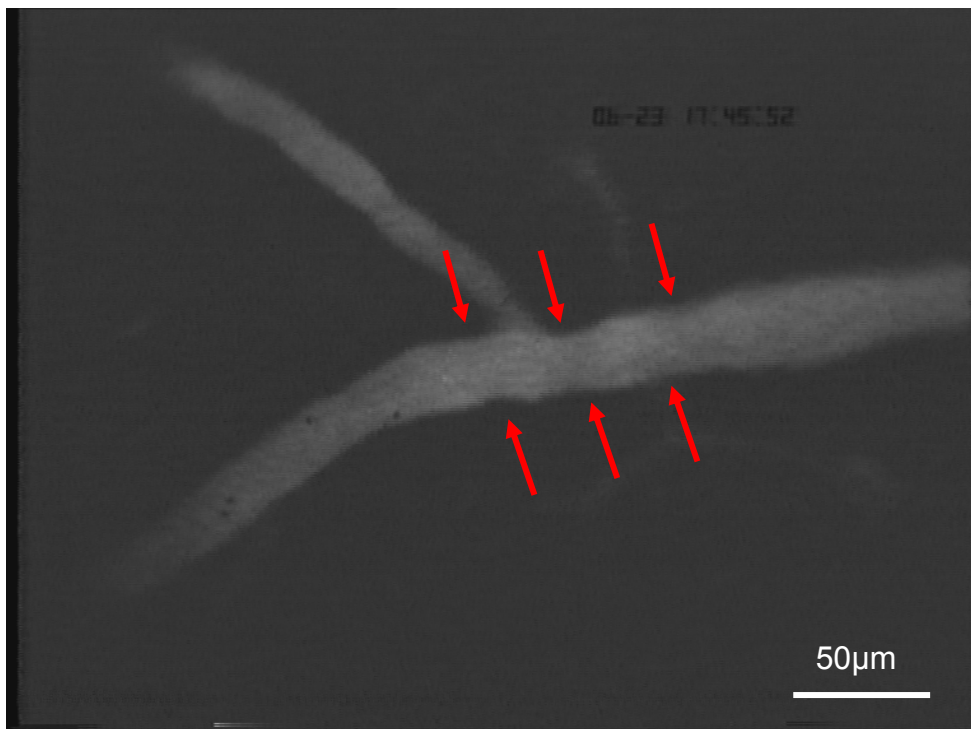


Abbildung 25. Exemplarische Darstellung einer Arteriole mit ihren deutlich sichtbaren Pearl-and-String Mikrovasospasmen. Die Pfeile zeigen auf die Stellen mit der stärksten segmentalen Kontraktion. Aufgenommen drei Stunden nach Induktion der SAB.

klar identifiziert und näher quantifiziert. Die durchschnittliche Abnahme des Gefäßdurchmesser aller spastischen Gefäße betrug 33% ($p < 0.001$).

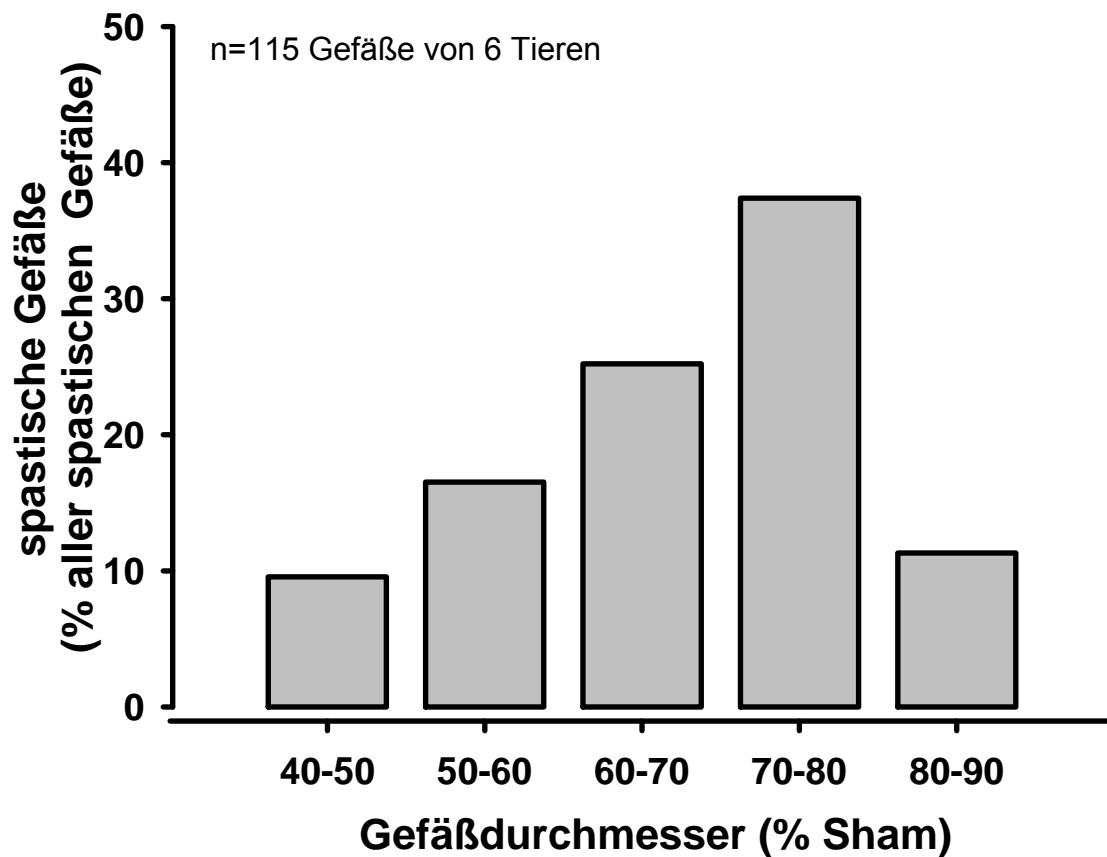


Abbildung 26. Anzahl der Mikrovasospasmen bezogen auf den Gefäßdurchmesser

Aufgeschlüsselt nach der Stärke des Spasmus zeigten 9,5% der 115 Mikrovasospasmen einen Durchmesser von nur noch 40-50% der Gefäßdurchmesser Sham operierter Tiere, 16,5% einen Durchmesser von 50-60%, 25,2% von 60-70%, 37,4% zeigten 70-80% der Sham-Werte und schließlich 11,4% wiesen einen Durchmesser von mehr als 80% der Gefäßdurchmesser von Sham Tieren auf.

Es stellte sich weiter die Frage, ob alle Gefäßkategorien gleichermaßen von Mikrovasospasmen betroffen waren. Um diese Frage zu klären wurde die Stärke des Mikrovasospasmus gegen den entsprechenden Gefäßdurchmesser aufgetragen: Gefäße mit einem Durchmesser von 10-20µm zeigten einen Spasmus von $61,8 \pm 2,4$ % der entsprechenden Sham Abschnitte. Die nächstgrößeren Gefäße zeigten einen Trend hin zu einem schwächeren Mikrovasospasmus mit einem Spasmus $65,3 \pm 1,5$ %. Auch die Gefäße der Kategorie 30-40µm und 40-80µm zeigten einen Spasmus von $72,2 \pm 1,7$ % bzw. $76,8 \pm 1,9$ %. All diese spastischen Veränderungen waren verglichen mit nicht spastischen Gefäßabschnitten statistisch signifikant (Abb. 27).

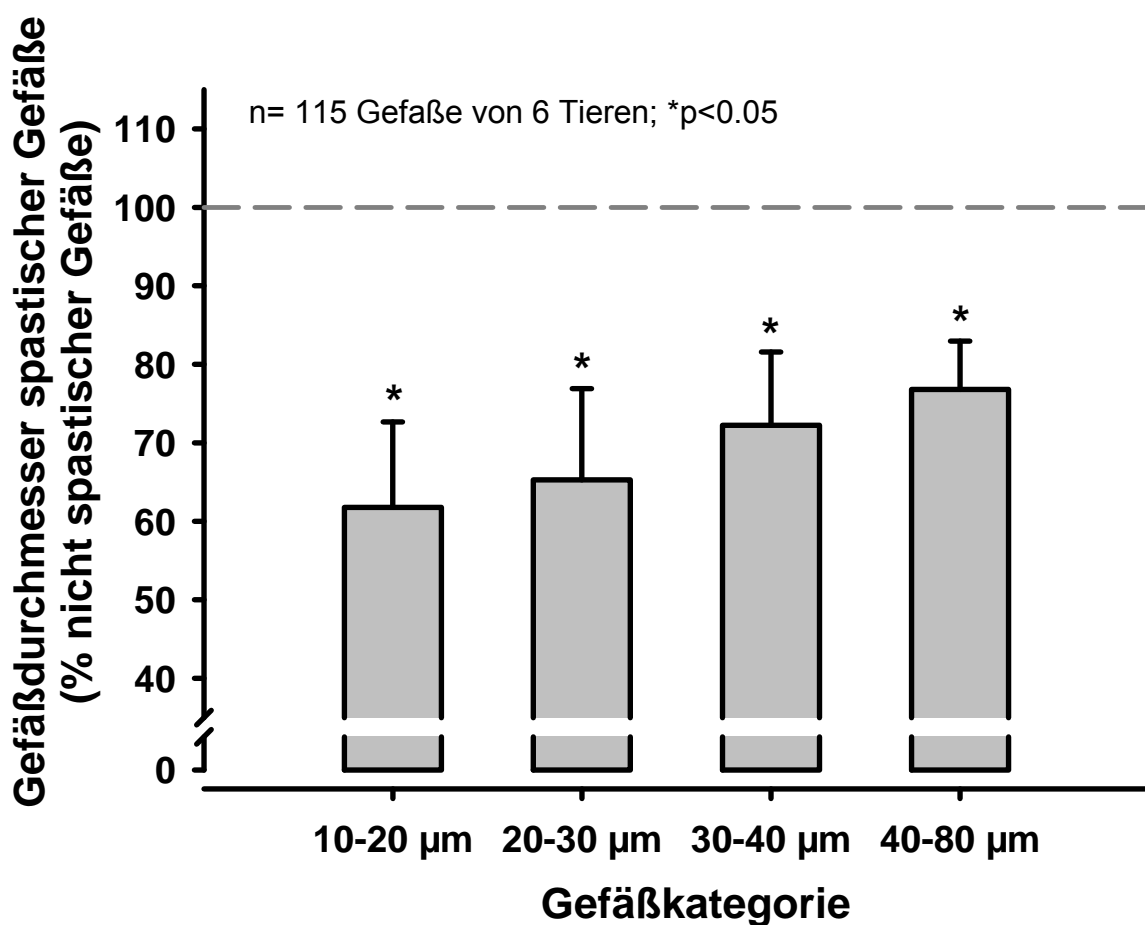


Abbildung 27. Quantifizierung des Mikrovasospasmus 3h nach SAB bezogen auf den Gefäßdurchmesser der entsprechenden nicht spastischen Gefäße. Es zeigt sich ein Trend, daß kleine Gefäße einen stärkeren Spasmus erkennen lassen.

3.9. Thromben

Bei der Anwendung des Strahler-Schemas auf die Gefäße drei Stunden nach Induktion eines SAB fiel neben den unter 3.8. beschriebenen Mikrovasospasmen ebenfalls

eine starke Thrombozytenaggregation auf. Diese führte bis zum kompletten Verschluss des Gefäßes (Abb. 28). Diese Thromben waren gekennzeichnet durch ein hell leuchtendes Aggregat im Gefäßlumen. Sie veränderten sichtbar die Flußeigenschaften des Blutes, indem sie die sonst beinahe nicht sichtbare laminare Strömung in eine sichtbare turbulente Strömung veränderten und die Flußgeschwindigkeit deutlich sichtbar herabsetzten.

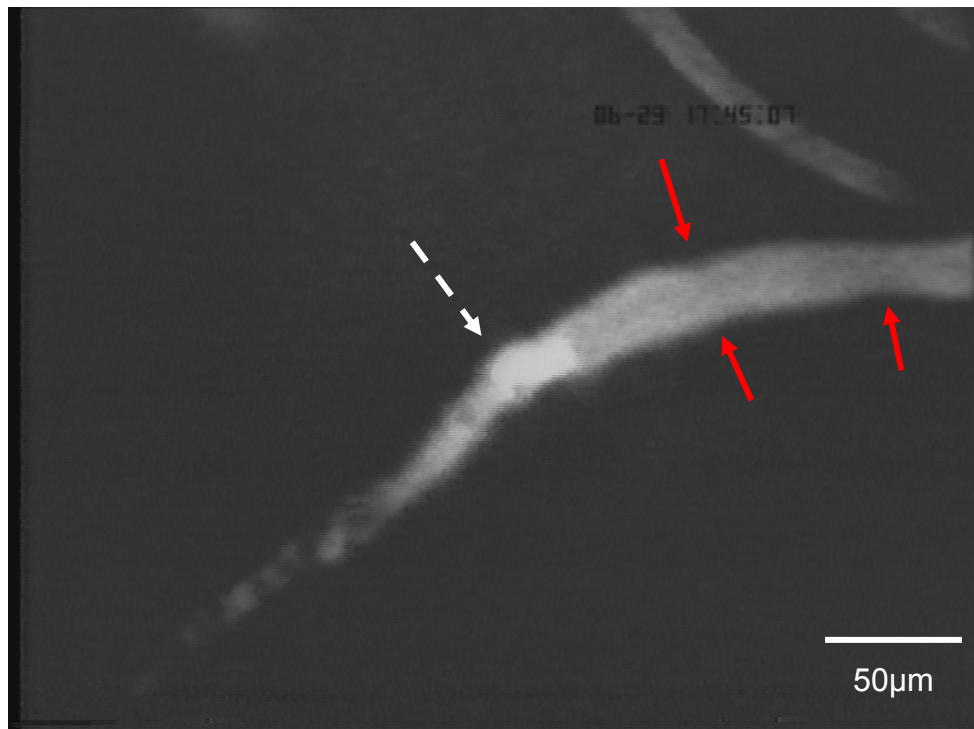


Abbildung 28. Exemplarische Darstellung eines Thrombus (weißer, gestrichelter Pfeil), welcher sich 3 Stunden nach Induktion der SAB gebildet hat und das Gefäßlumen beinahe vollständig verlegt. Deutlich sind auch hier die Mikrovasospasmen zu sehen (rote Pfeile).

Das Phänomen der arteriellen Thromben zeigte sich fast ausschließlich in Gefäßen, die spastisch waren. In 113 untersuchten Gefäßen mit einem Mikrovasospasmus zeigten sich insgesamt 40 klar identifizierbare Thromben. Im Gegensatz dazu waren in 232 Gefäßen ohne Mikrovasospasmus nur zwei Thromben nachzuweisen. Unterwarf man diese Daten einem χ^2 -Test, ergab dieser hierfür einen deutlich signifikanten Wert von $p < 0,001$ (Abb. 29.). Jedoch waren Thromben und Mikrovasospasmen, wenn auch im gleichen Gefäß, so doch nicht direkt kolokalisiert. Sie fanden sich also

nicht direkt in den spastischen Gefäßabschnitten, sondern jeweils ein wenig distal der Spasmen bzw. zwischen zwei spastischen Zonen.

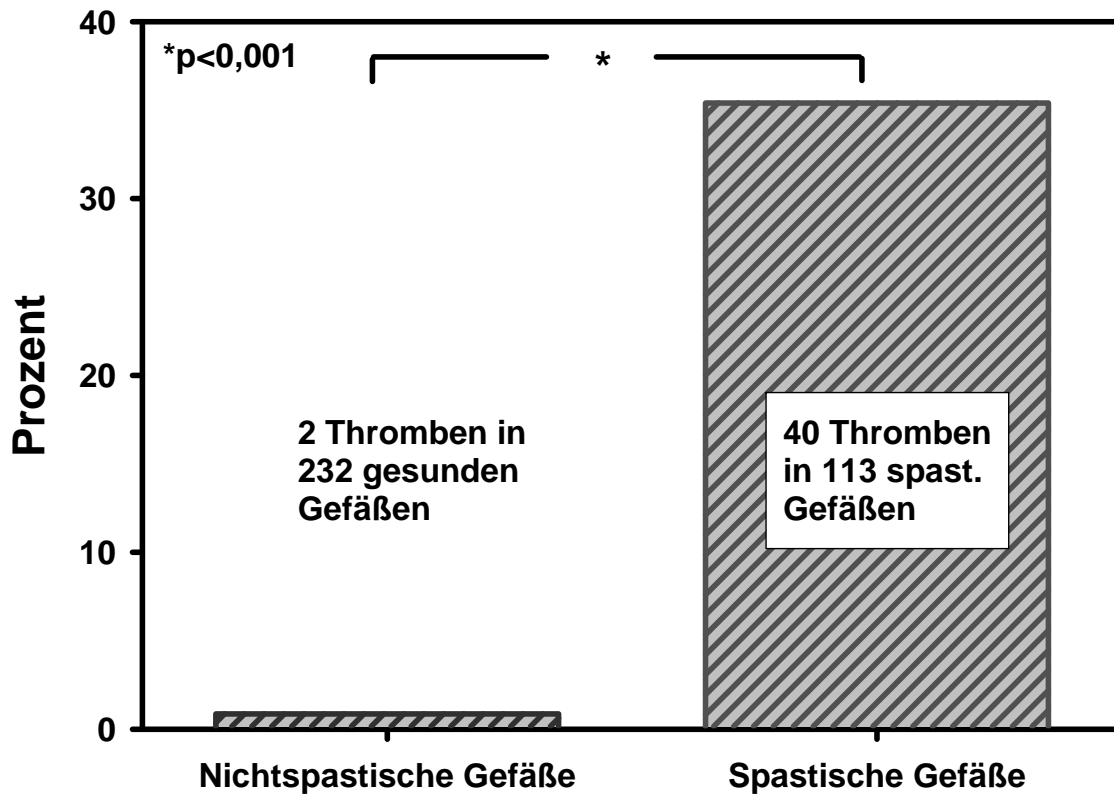


Abbildung 29. Prozentuale Verteilung der Thromben in spastischen und nichtspastischen Gefäßen in Tieren drei Stunden nach Induktion einer SAB.

Das zeitliche Auftreten der Thromben nach Untersuchungsbeginn zeigte einen quasi linearen Verlauf. Von den 40 insgesamt entdeckten und quantifizierten Thromben, waren innerhalb der ersten 15-30 Minuten 10 bereits aufgetreten. 30-45 Minuten nach Untersuchungsbeginn 8 neue Thromben, 45-60 Minuten nach Untersuchungsbeginn 13 weitere und nach mehr als 60 Minuten weitere 8 Thromben (Abb. 30).

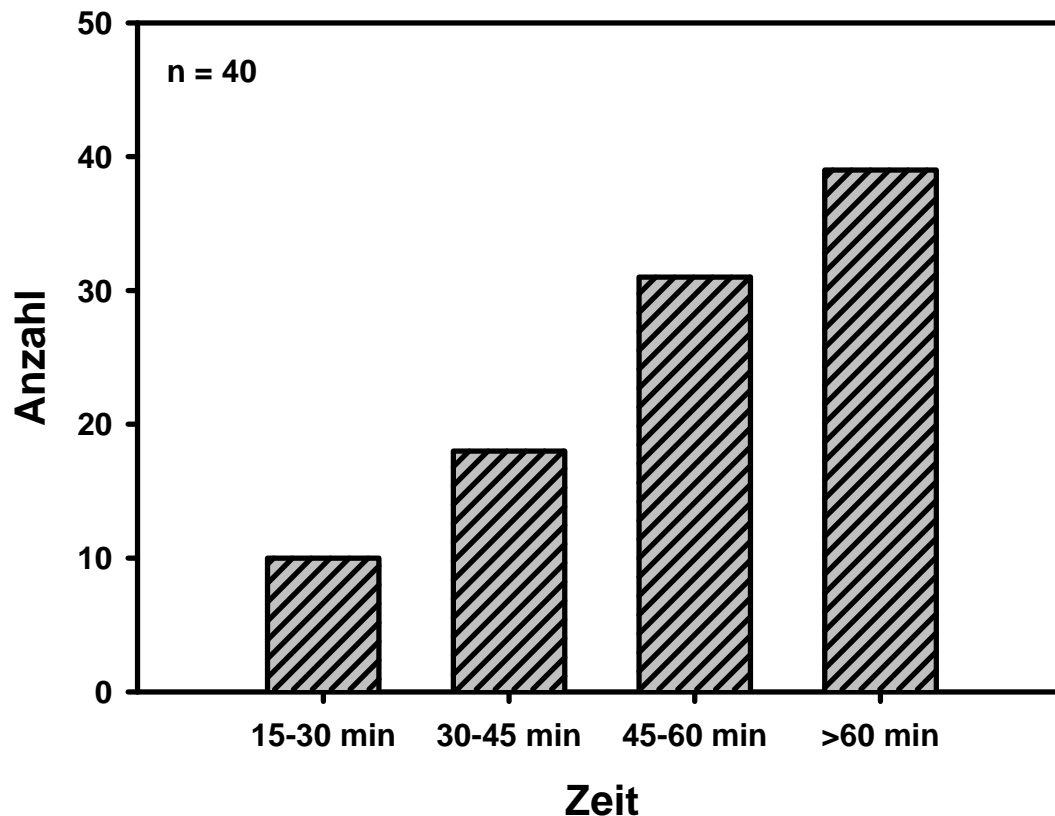


Abbildung 30. Zeitlicher Verlauf des Auftretens von Thromben im arteriellen Strömungsgebiet drei Stunden nach Induktion einer SAB

Das Phänomen der Mikrothrombenentstehung könnte sich aus rheologischen Gesichtspunkten erklären. Nach der Virchow-Trias, bestehend aus „Stase, Endothelschaden und gestörte Gerinnung“, könnte ein Mikrovasospasmus zu einer Verlangsamung des Blutflusses und somit zu einer erhöhten Neigung zur Thrombenentstehung führen. Analysiert man die Anzahl der Thromben bezogen auf den Grad des Mikrovasospasmus, so zeigt sich, daß die Gefäße mit dem stärksten Spasmus von 40-50% des Baselinedurchmessers 5 von 40 Thromben aufweisen, wohingegen in Gefäßen mit einem Mikrovasospasmus von 60-70% des Baselinedurchmessers 12 von 40 Thromben aufzufinden waren (Abb. 31).

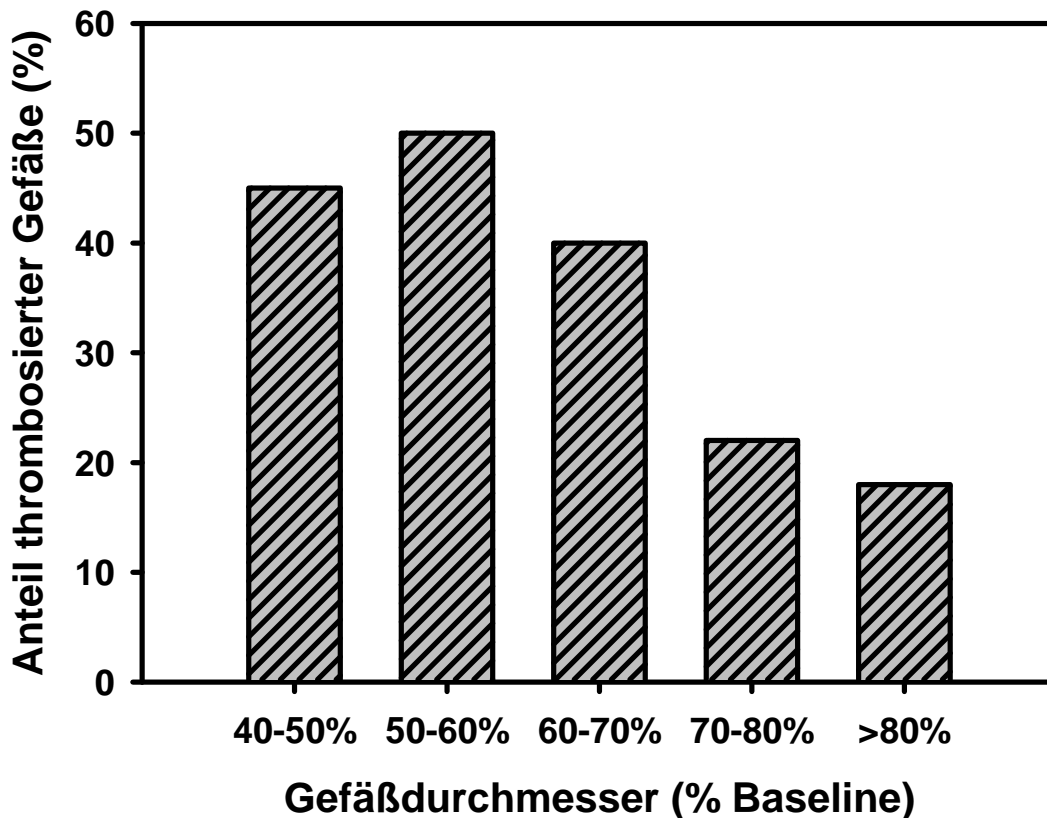


Abbildung 31. Anteil thrombosierter Gefäße bezogen auf die Stärke des Mikrovasospasmus

Schließlich stellte sich noch die Frage, ob die Thrombenentstehung gleichmäßig auf alle Gefäße der pialen Mikrozirkulation verteilt ist, oder ob sich gewisse Foci des Geschehens klären lassen. Hierzu standen die unter 3.7. gewonnenen Daten der Strahlerschemas zur Verfügung. Da dies erstmals eine eindeutige Einordnung einzelner pialen Gefäße der Maus in ein hierarchisches Ordnungssystem erlaubt, wurden nun die Gefäße, in welchen sich Thromben gebildet hatten, den einzelnen Gefäßkategorien zugeordnet. Hier zeigte sich, daß 16,7 % der untersuchten Gefäße der Kategorie 1 einen Thrombus enthielten, 77,7% der Kategorie 2, 60% der Kategorie 3, 34,6% der Kategorie 4, 31,6% der Kategorie 5 und nur 8,7% der Kategorie 6 (Abb. 32).

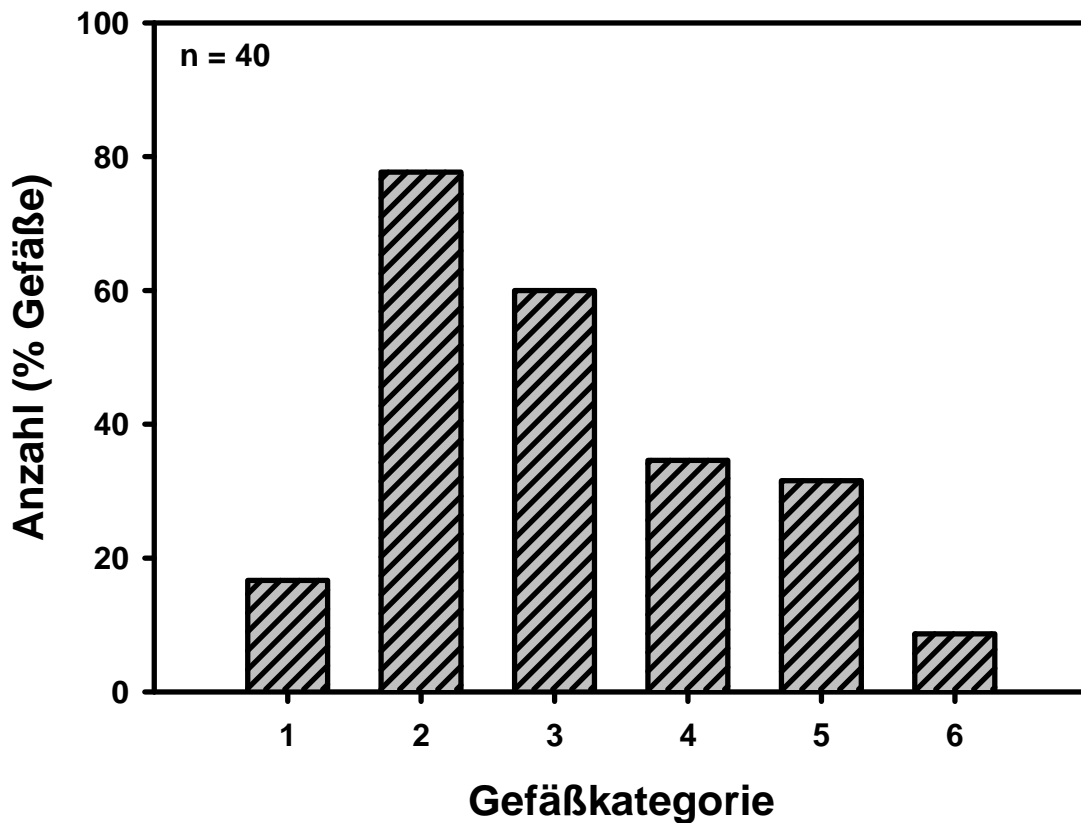


Abbildung 32. Prozentualer Anteil der Gefäße der einzelnen Gefäßkategorien, welche einen Thrombus aufweisen.

3.10. Hemmung der Thrombozytenaggregation

Die Gabe von 0,36µg/g KG Tirofiban ergab 15, 45, 60 und 120 Minuten nach Applikation eine deutlich signifikante Verlängerung der Blutungszeit als Zeichen der erfolgreichen Hemmung der Thrombozytenaggregation durch Tirofiban. Nach 24 Stunden war der die Blutungszeit verlängernde Effekt vollkommen verschwunden (Abb. 33).

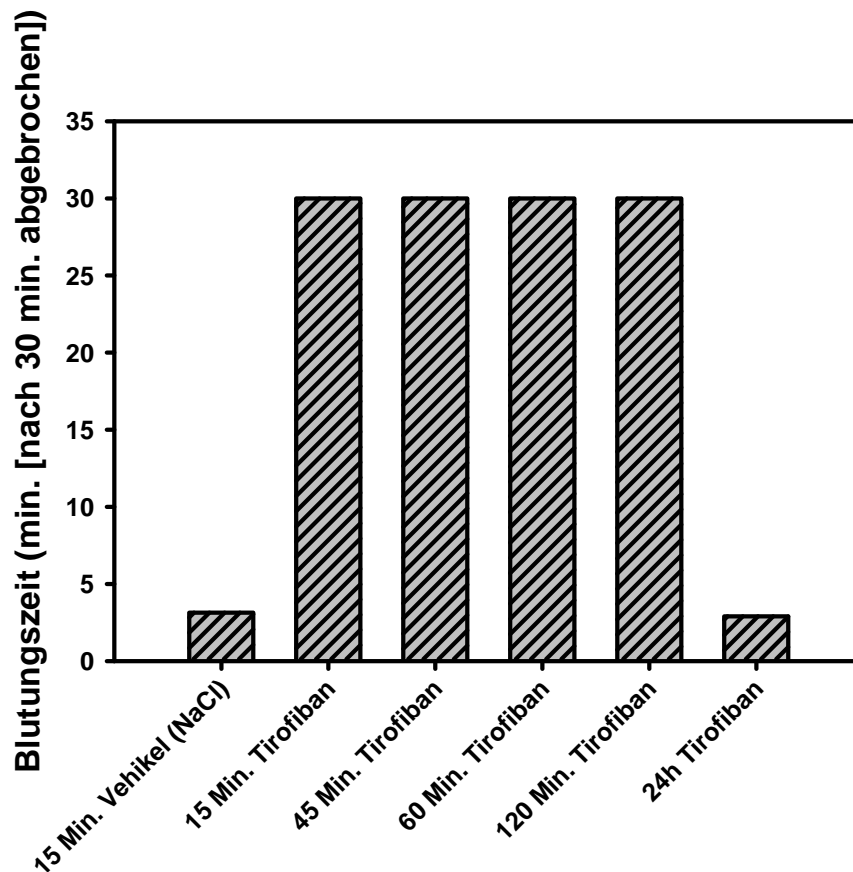


Abbildung 33. Darstellung der Blutungszeit nach der Gabe von 0,36 μ g/g KG Tirofiban zu verschiedenen Zeitpunkten

Bei der intraoperativen Beobachtung des ICP über eine Stunde nach Induktion der SAB zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Tieren, welche mit 0,36 μ g/g KG Tirofiban oder mit einer entsprechenden Menge NaCl behandelt wurden. Direkt nach der Perforation des Gefäßes stieg der ICP bei den mit Tirofiban behandelten Tieren auf $80,43 \pm 11,18$ mmHg. Die mit NaCl behandelten Tiere zeigten mit $79,98 \pm 11,17$ einen beinahe identischen ICP Anstieg. Auch die Erholung des ICP war in beiden Versuchsgruppen sehr ähnlich. Fünf Minuten nach Induktion der SAB hatten die mit Tirofiban behandelten Tiere einen ICP von $32,3 \pm 4,4$ mmHg, die mit NaCl behandelten einen Wert von $26,72 \pm 6,37$ mmHg. Am Ende des Beobachtungszeitraums von einer Stunde lag der ICP bei den Tirofiban-Tieren bei $22,84 \pm 2,25$ mmHg, bei den mit NaCl behandelten Tieren lag der ICP bei $23,1 \pm 1,96$ mmHg (Abb. 34).

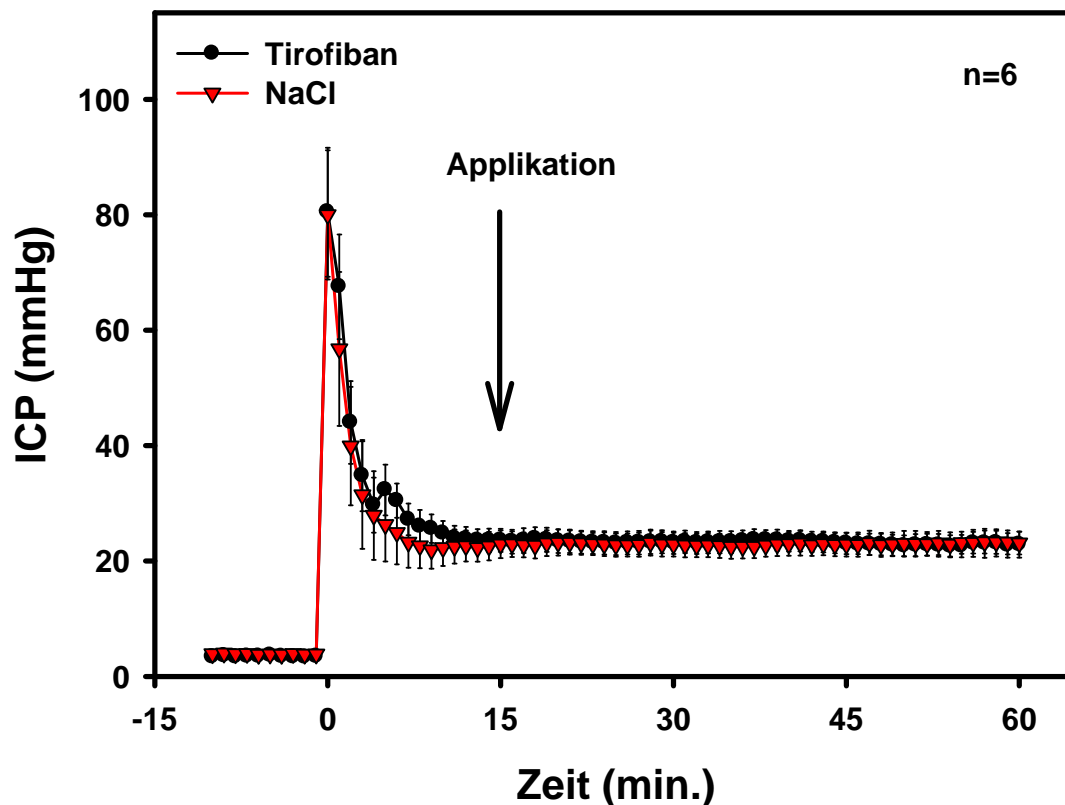


Abbildung 34. Entwicklung des intrazerebralen Druckes über den Zeitraum einer Stunde nach Induktion der SAB im Vergleich von Tirofiban und NaCl

Auch die zerebrale Durchblutung, gemessen mit Hilfe der Laser-Doppler-Fluxmetrie ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Versuchsgruppen. Mit der Perforation des Gefäßes sank die zerebrale Durchblutung in beiden Versuchsgruppen dramatisch ab (Tirofiban: $23,32 \pm 4,64$ %; NaCl: $15,55 \pm 2,49$ %), erholte sich jedoch sehr schnell wieder. Erst gegen Ende der Beobachtungszeit von einer Stunde zeigte sich ein Trend zu unterschiedlicher zerebraler Durchblutung. Die mit Tirofiban behandelten Tiere hatten nach einer Stunde eine zerebrale Durchblutung von $71,37 \pm 10$ %. Im Gegensatz dazu hatte sich die Durchblutung der Tiere, die eine Injektion mit NaCl erhalten hatten, mit $84,08 \pm 11,98$ % leicht besser erholt. Jedoch gab es hierbei zu keinem Zeitpunkt eine statistisch signifikante Abweichung (Abb. 35).

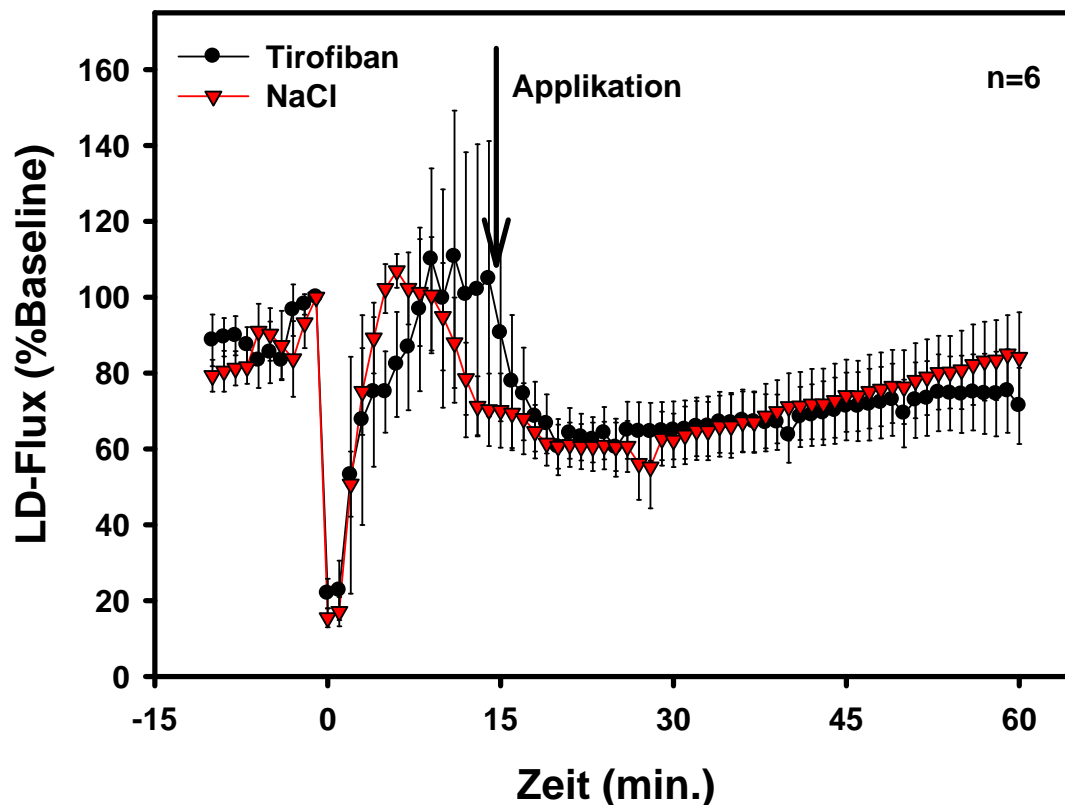


Abbildung 35. Entwicklung der intrazerebralen Durchblutung über den Zeitraum einer Stunde nach Induktion der SAB im Vergleich von Tirofiban und NaCl

Auch in bezug auf das Outcome in den nächsten Tagen nach SAB zeigten sich keinerlei statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Versuchsgruppen. In beiden Gruppen verstarben innerhalb der ersten 24 Stunden zunächst zwei Tiere (33,3 %). Bei den mit Tirofiban behandelten Tieren verstarb drei Tage nach SAB ein weiteres Tier, so daß die Gesamtmortalität der Tirofiban-Tiere bei 50 % lag (Abb. 36). Auch in bezug auf die Gewichtsentwicklung verhielten sich beide Gruppen sehr ähnlich. Die Tiere beider Versuchsgruppen verloren innerhalb der ersten drei Tage nach SAB deutlich Gewicht (Tirofiban: $79,92 \pm 2,07$ %; NaCl: $84,42 \pm 4,23$ %) und erholten sich hiernach wieder. Das Ausgangsgewicht wurde jedoch auch nach sieben Tagen nicht erreicht (Tirofiban: $88 \pm 3,31$ %; NaCl: $93,57 \pm 6,35$ %), jedoch erholten sich die mit NaCl behandelten Tiere schneller und besser (Abb. 37).

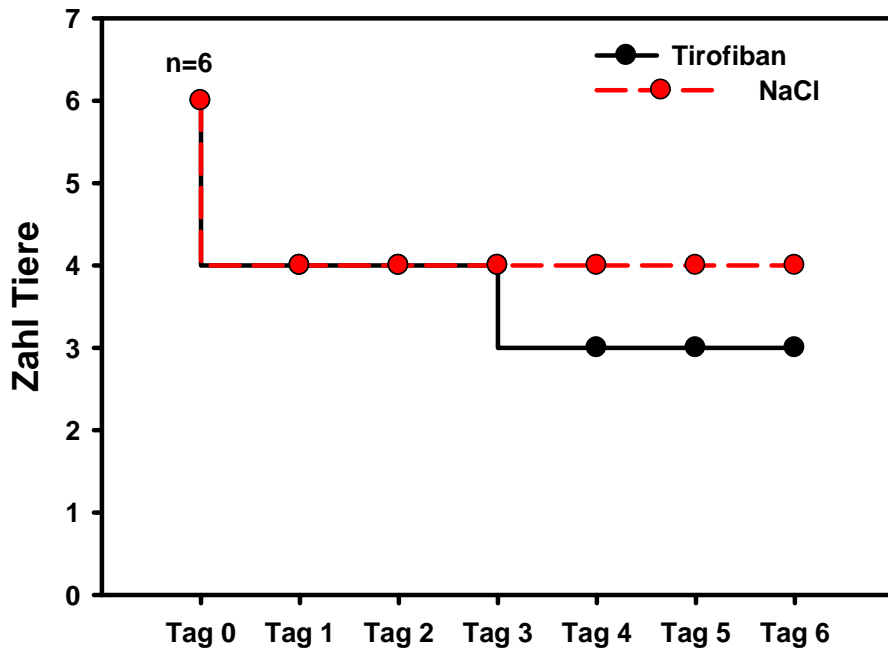


Abbildung 35. Mortalität der mit Tirofiban und NaCl behandelten Tiere

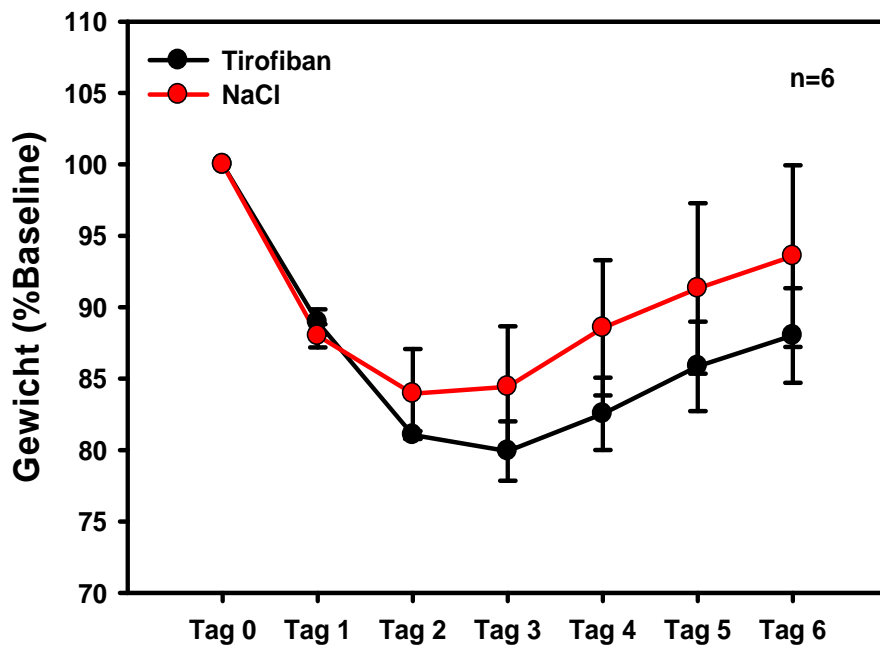


Abbildung 36. Gewichtsverlauf der mit Tirofiban oder NaCl behandelten Tiere

4. Diskussion

4.1. Methoden

4.1.1. Auswahl des Versuchstieres

Die zerebrale Ischämie und das neuronale Trauma werden heutzutage am häufigsten in Nagern erforscht. Durch Inzucht haben sie eine große genetische Homogenität und zeigen desweiteren einen äußerst hohen Grad an Homologie bzgl. Genetik, Physiologie und Pathophysiologie zu höheren Säugetieren. Darüber hinaus ist die ethische Akzeptanz der Nutzung von Nagetieren verglichen mit anderen Versuchstieren wie Hund oder Primaten deutlich höher. Die Aufzucht und Haltung ist preiswert, und auch die Menge der zu Testzwecken eingesetzten Substanzen ist auf Grund des niedrigen Gewichtes der Nager gering. Zudem ist das Genom der Nager komplett entschlüsselt, und es sind sehr viele Antikörper gegen bestimmte Moleküle nur für den Nager erhältlich. Aufgrund der verfeinerten mikrochirurgischen Techniken stellen heute die operativen Verfahren auch in Tieren mit kleinem Gewicht und kleiner Größe kein entscheidendes Problem da. Die am häufigsten eingesetzten Tiere sind hier Mäuse und Ratten. Die SAB wurde im Nager in der Regel in Ratten erforscht^{119,151,162}. Die Entscheidung für die hier vorgenommene Erforschung der SAB in der Maus hatte einen Hauptgrund:

Die dünne Dura Mater und der schmale Subarachnoidalraum erlauben eine Epifluoreszenzmikroskopie bei intakter Dura. Bei größeren Versuchstieren wie z.B. Ratten ist die nicht möglich. Hier muss die Dura Mater entfernt werden und das Gehirn während der Messungen konstant mit einem künstlichen zerebro-spinalen Liquor gespült werden³⁹. Dies gestaltet sich als technisch äußerst schwierig und ist sehr störanfällig. Auch besteht hierbei die Gefahr der Entwicklung eines Hirnödems. Die außergewöhnlich feine Dura Mater der Maus erlaubte im Gegensatz hierzu eine störungsfreie Beobachtung der zerebralen Mikrozirkulation. Da in unserer Arbeitsgruppe bereits die fokale Ischämie und das Schädel-Hirn-Trauma intravitalmikroskopisch erforscht wurden, gab es somit eine Vielzahl von Vergleichsdaten.

4.1.2. Narkose

Die häufigste Narkoseform bei Mäusen und Ratten stellt die Kombination aus Xylazin und Ketamin dar, welche entweder i.m. oder i.p. appliziert wird^{41,200}. Diese Anästhesieform ist jedoch äußerst schlecht zu steuern. Lange Nachschlafzeiten mit daraus

resultierendem Hypoglykämie- und Hypothermierisiko sind beschrieben⁴⁶. Darüber hinaus ist Ketamin für seine neuroprotektiven Effekte bekannt, wodurch Ketamin als Anästhetikum für die Erforschung neuronaler Prozesse ausscheidet^{20,45,93,126}. Inhalationsnarkotika stellen hierfür eine Alternative dar. Sie haben nur eine sehr kurze Halbwertszeit, d.h. die Tiere wachen sehr bald nach Beendigung der Narkose wieder auf, und somit werden die oben genannten Risiken umgangen. Jedoch sind auch Inhalationsnarkotika wie z.B. Halothan oder Isofluran erwiesenermaßen neuroprotektiv. Einerseits wurde nachgewiesen, daß sowohl die Ausschüttung endogener Katecholamine durch inhalative Narkotika⁶⁶ wie auch der zerebrale Metabolismus und ATP Verbrauch durch Halothan vermindert wird¹²⁴. Darüber hinaus haben inhalative Narkotika eine starke Auswirkung auf die zerebrale Durchblutung. Initial ist eine 10-20%ige Dilatation der pialen Gefäße bei Insufflation von Halothan beschrieben⁹². Bei Langzeitversuchen sind jedoch auch die gegenteiligen Effekte in Form einer Reduktion der zerebralen Durchblutung um bis zu 50% bekannt¹⁷⁵. Ergebnisse von Brussel et al. deuten darauf hin, daß die Autoregulation der zerebralen Durchblutung nach Inhalation von Halothan außer Kraft gesetzt ist¹⁴. All diese Faktoren schlossen die Verwendung einer Inhalationsnarkose für die Versuche aus. Aus diesem Grund wurden die Versuche mit einer Kombination aus Midazolam, Medetomidin und Fentanyl durchgeführt. Diese Narkoseform kann vollständig antagonisiert werden, und es sind bis heute keine neuroprotektiven Effekte bekannt. Das einzige Problem dieser Narkoseform liegt darin begründet, daß der Antagonist des Fentanyls, Naloxon, eine deutliche kürzere Halbwertszeit als Fentanyl selber aufweist. Somit bestand die Möglichkeit eines „Hang-Over“ mit anschließender respiratorischer Insuffizienz. Dies konnte verhindert werden, indem die gewichtsadaptierte Narkose sorgfältig eingehalten wurde und somit zum Ende des Versuches nur noch eine kleine Menge Fentanyl im Kreislauf verfügbar war, das vollständig und dauerhaft antagonisiert werden konnte.

4.1.3. Induktion der Subarachnoidalblutung

In den letzten 30 Jahren wurde eine Vielzahl an Methoden an vielen verschiedenen Spezies entwickelt, um die SAB zu untersuchen. Es gibt einige Kriterien, die ein Tiermodell erfüllen muss, um die Pathophysiologie der SAB sinnvoll untersuchen zu können:

- Das Modell sollte den Blutungsverhältnissen und der Verteilung der Blutung nach Ruptur eines zerebralen Aneurysmas beim Menschen entsprechen.
- Die Veränderungen sollten standardisierbar und reproduzierbar sein.
- Die Letalität sollte der beim Menschen entsprechen.
- Das Modell sollte Beobachtungen über einen Zeitraum hinweg erlauben und es somit ermöglichen, sowohl die frühen wie auch die späten Effekte einer SAB zu untersuchen.

1979 wurde das erste SAB Tiermodell in der Ratte von Barry et al. entwickelt ⁸. Hierbei wurde die A. basilaris punktiert und die Folgen konnten direkt beobachtet werden. Seit jener Zeit wurde eine Vielzahl unterschiedlicher Modelle entwickelt, welche sich grob in folgende Gruppen einteilen lassen:

- Operative Darstellung eines Gefäßes und dessen Exposition zu autologem Blut.
- Punktion einer Arterie mit anschließender Blutung ^{10,142}.
- Injektion von autologem Blut in den Subarachnoidalraum als einmalige Injektion in die Cisterna magna ^{24,102,117,178} oder Cisterna chiasmatica ¹⁴⁴, oder als Doppelinjektion autologen Blutes in beide Cisternen ^{120,181}.

Modelle, welche auf der Injektion von Blut basieren, haben einige entscheidende Nachteile. Zunächst einmal fehlt der Endothelschaden, welcher bei der Ruptur eines zerebralen Aneurysmas beim Menschen auftritt. Auch ist die Mortalität dieser Modelle mit 0-15% überhaupt nicht mit der des Menschen zu vergleichen. Außerdem erholt sich bei diesen Modellen die zerebrale Durchblutung meist innerhalb von 15 Minuten und bildet die Klinik somit nicht adäquat ab. In der vorliegenden Arbeit wurde eine in unserer Arbeitsgruppe entwickelte Variante des von Bederson et al. beschriebenen intraluminalen Fadenmodells verwendet. Dieses Modell, welches in die zweite Kategorie der oben genannten SAB Modelle fällt, hat die meisten Analogien zur Ruptur eines zerebralen Aneurysmas beim Menschen. Der initial rasche Anstieg des ICP und der simultane Abfall des CBF entsprechen der Pathologie beim Menschen. Auch die Mortalität von 30-50% entspricht derjenigen, welche in der Literatur für Menschen angegeben wird.

Dieses intraluminale Fadenmodell birgt jedoch auch einige Fehlerquellen. Es besteht die Möglichkeit, daß nach Induktion der SAB der Faden verzögert wieder in die A.

carotis ext. zurückgezogen wird und somit eine verzögerte zweite Blutung erfolgt, welche beim Menschen so nicht beschrieben ist. Auch besteht beim Entfernen des Perforationsfadens aus dem Stumpf der A. carotis ext. die Gefahr eines hohen Blutverlustes. Diese Gefahren ließen sich jedoch durch ausreichende Übung minimieren. Die zweite Blutung wurde verhindert indem der Faden nach Induktion der SAB unmittelbar und in einem Zug wieder in die A. carotis ext. zurückgezogen wurde, und auch das Problem des starken Blutverlustes konnte durch ausreichendes Training minimiert werden. Somit stellt das intraluminale Fadenmodell zur Induktion der SAB ein Modell dar, welches relativ einfach zu erlernen, zu einem hohen Maße reproduzierbar und standardisierbar ist und die Pathologie und Klinik der Ruptur eines zerebralen Aneurysmas beim Menschen zu einem hohen Grad abbildet.

4.1.4. Intravitalmikroskopie

In dieser Arbeit wurden die piale Mikrozirkulation und deren Veränderungen nach Exposition mit Blut im Rahmen einer Subarachnoidalblutung mit Hilfe der Methode der Intravitalmikroskopie untersucht. Diese Methode erlaubt die quantitative Analyse des Gefäßdurchmessers am lebenden Gehirn. Die Beobachtungen konnten zu verschiedenen Zeitpunkten wiederholt werden, um einen dynamischen Zeitverlauf der Veränderung der Mikrozirkulation nach SAB zeichnen zu können. Nur die Methode der Intravitalmikroskopie lässt es zu, diese Parameter *in vivo* ohne Schädigung des Gehirnes zu untersuchen.

Der Durchmesser zerebraler Gefäße und deren Reaktion auf Blut oder andere Substanzen kann zwar auch *in vitro* gemessen und untersucht werden, jedoch entsprechen die Verhältnisse eines chirurgisch entfernten Gefäßes, welches in ein Organbad eingebracht wurde, eindeutig nicht den physiologischen Bedingungen. Zunächst einmal geht durch die chirurgische Manipulation die Innervation des Gefäßes verloren. Auch fehlen die lokalen Faktoren (NO, Bradikinin, Serotonin, CO₂ etc.), die im das Gefäß umgebenden Interstitium vorhanden sind und welche *in vivo* die Weite eines Gefäßes bestimmen, bzw. diese Faktoren können nur mit äußerstem technischen Aufwand hinzugefügt und kontrolliert werden. Durch die Technik der Trepanation ohne Verletzung der Dura mater konnten die oben genannten Faktoren innerhalb der physiologischen Bedingungen des lebenden Gehirns gehalten werden. Allerdings ist mit der Intravitalmikroskopie nur die Beobachtung der oberflächlichen, pialen Gefäße möglich. Über die Gefäße in der Tiefe des Hirnparenchyms kann mit dieser

Technik keine direkte Aussage getroffen werden. Jedoch unterscheiden sich piale Gefäße bzgl. Vasoreaktivität und Endothelschicht nicht von solchen, welche tief in das Hirnparenchym ziehen.

Im Rahmen dieser Untersuchung wurde das Plasma der Versuchstiere mit dem Farbstoff Fluoresceinisothiocyanat gebunden an Dextran mit einem Molekulargewicht von 150000 Dalton angefärbt. Dies ist eine weitverbreitete und gut beschriebene Methode^{89,155}. Durch den Einsatz von nur 0,15 ml einer 0,5%igen Lösung bei langsamer Applikation konnte ein hämodiluirer Effekt und eine Hypervolämie ausgeschlossen werden. Die Emmisionseffektivität und die Färbeeigenschaften waren bei einmaliger Gabe des Farbstoffes über die Dauer des Versuchs hinweg ausreichend. Die Extravasation des Farbstoffes als Zeichen einer gestörten Blut-Hirnschranken-Aktivität war zu keiner Zeit zu beobachten.

Um phototoxische Effekte und ein Ausbleichen des Farbstoffes zu vermeiden, wurde die Aufnahmedauer pro Meßgebiet und Meßzeitpunkt auf 10 Sekunden begrenzt. Die hochempfindliche SIT-Restlichtkamera in Verbindung mit einem 25x Salzwasserimmersionsobjektiv erlaubte die Verwendung von Erregerlicht sehr geringer Intensität. Eine Störung der Blut-Hirnschranke als sehr sensibler Marker eines phototoxischen Schadens¹²⁵ konnte, wie oben erwähnt, zu keiner Zeit des Versuches beobachtet werden.

Aufgrund der begrenzten Tiefenschärfe des Intravitalmikroskops, konnten in großlumigen Gefäßen durch Einstellen des Fokus scheinbar unterschiedliche Gefäßdurchmesser beobachtet werden. Um dieses Problem zu umgehen, wurde so fokussiert, daß jeweils der maximal mögliche Durchmesser erkennbar war. Auch wurde pro Gefäßaufnahme bei der Auswertung der Durchmesser dreimal getrennt bestimmt und aus den sich ergebenden Werten der Mittelwert als tatsächlicher Durchmesser akzeptiert.

4.1.5. Strahler-Ordnungsschema

Da im Rahmen dieser Arbeit die Gefäßdurchmesser verschiedener Tiere, welche entweder gesund waren oder unter einer SAB litten, miteinander verglichen werden mussten und entschieden werden musste, ob diese normal oder verändert sind, war es erforderlich absolute Werte der Gefäßdurchmesser der pialen Widerstandsgefäße der C57/Bl6 Maus zu erhalten. Diese sind jedoch in der Literatur nicht bekannt. Somit

mussten diese erstmals bestimmt werden. Ein hervorragendes System, um stark verzweigte dendritische Systeme zu charakterisieren, ist das Strahler- bzw. Strahler-Horton-Schema¹⁸⁰, welches 1944 entwickelt wurde, um Flußsysteme in Hochplateaus in Arizona, USA zu untersuchen. Dieses Ordnungsschema erlaubt die relative einfache Einordnung auch hochkomplexer Flußsysteme in eine relativ überschaubare Anzahl an Ordnungskategorien. Es ist ein in den Biowissenschaften auf die meisten Organsysteme zufriedenstellend angewandtes System^{40,87,94}, welches in diesem Versuchsaufbau dem Zweck entsprechend leicht verändert wurde.

In dem originalen Strahler-Horton-Schema wird eine höhere Ordnung nur erreicht, wenn zwei Subsysteme gleicher Ordnung zusammentreffen. Treffen zwei Subsysteme unterschiedlicher Ordnung aufeinander, wird die Ordnungszahl des höherklassigen Subsystems beibehalten. Für die pialen Widerstandsgefäße der Maus war dies nicht praktikabel, da es häufig vorkam, daß zwei Arterien verschiedener Ordnung aufeinander trafen. Somit hätte sich bei Einhaltung des oben genannten Systems nur eine extrem niedrige Ordnungshierarchie ergeben, welche anschließend eine massiv große Spanne beinhaltet hätte. Dies wäre für eine genaue Differenzierung der pialen Widerstandsgefäße der C57/Bl6 Maus nicht sinnvoll gewesen. Aus diesem Grund wurde das Strahler-Horton-Schema dahingehend abgeändert, daß auch bei dem Zusammentreffen von zwei Arterien verschiedener Ordnung das daraus resultierende Gefäß die nächst höhere Ordnungsstufe zugewiesen bekam. Auf diese Weise konnte eine ausreichend differenzierte Ordnungshierarchie erstellt werden, welche auch als Positivprobe eine adäquate Einordnung eines Gefäßes bei gegebenem Gefäßdurchmesser in seine Ordnung erlaubte. Somit war es erstmals möglich mit Hilfe des modifizierten Strahler-Horton-Schemas eine differenzierte Quantifizierung der pialen Gefäßarchitektur der C57/Bl6 Maus anzufertigen und somit gesunde und kranke Tiere direkt miteinander zu vergleichen.

4.2. Ergebnisse

4.2.1. Intrakranieller Druck

Mit Induktion der SAB stieg der ICP schlagartig auf Werte von ~70 mmHg an. Dies kann in dieser Situation einzig durch die Perforation eines zerebralen Gefäßes und der daraus folgenden Blutung in den Subarachnoidalraum erklärt werden. Nach dem initialen Druckanstieg folgte recht schnell wieder ein Abfall auf ~20 mmHg, und auf diesem Niveau blieb der Hirndruck auch in der Folge. Verschiedene Arbeiten bele-

gen, daß dieser Hirndruck für Stunden bis Tage vorliegt^{10,74,163}. Dies zeigt, daß das intraluminale Fadenmodell auch in der Maus sicher und reproduzierbar angewandt werden kann und im wesentlichen der Pathologie des Menschen entspricht^{13,53,193}.

4.2.2. Verteilung des Blutes im Subarachnoidalraum

Sowohl makroskopisch als auch mikroskopisch konnte deutlich das Blut sowohl um die Gefäße als auch in den Gyrierungen des Gehirns gesehen werden. Dieses Verteilungsmuster ist typisch und ist genau so auch beim Menschen beschrieben (Abb. 37).

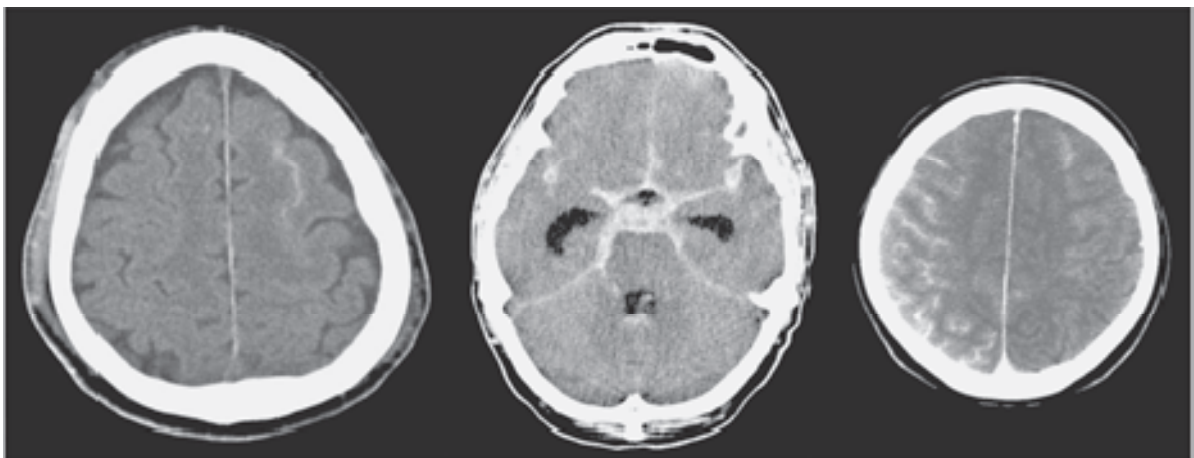


Abbildung 37. Drei Beispiele für Computertomographische Aufnahmen nach einer Subarachnoidalblutung. Deutliche ist die hyperdense Blutansammlung entlang der Gyri und Sulci zu erkennen. Dies entspricht der beobachteten Verteilung des Blutes in den Versuchen. Bilder von Leber et al. [Subarachnoidalblutung: Herausforderung einer Diagnose] Journal für Neurologie, Neurochirurgie und Psychiatrie 2008; 9 (1): 28-32

Speziell durch den mikroskopischen Nachweis des Blutes um die Gefäße konnte sichergestellt werden, daß dieser entscheidende Faktor in der Pathogenese der Komplikationen nach SAB nicht nur vorhanden ist, sondern sich auch in der Untersuchungsregion in deutlich sichtbarer Menge befindet. Bisherige Untersuchungen zur Entstehung der zerebralen Vasospasmen bezogen sich meistens auf Blutbestandteile des ausgetretenen Blutes als auslösendes Agens. So wurde die Wirkung von Oxyhämoglobin und Methämoglobin untersucht¹¹⁴, aber auch mediatorgesteuerte Mechanismen mit zellulärer Komponente, wie Thrombozyten und Leukozyten, werden diskutiert^{37,139}. Auf die genaueren Möglichkeiten der Pathogenese wird in 4.2.6. noch

deutlicher eingegangen. Es ist jedoch deutlich, daß die Anwesenheit von Blut nicht nur generell im Subarachnoidalraum sondern auch ganz konkret um die Gefäße, welche untersucht werden von äußerster Wichtigkeit ist und dies ist in diesem Modell sichergestellt.

4.2.3. Outcome

Die Mortalität der Tiere nach SAB in der vorliegenden Arbeit von 33-50% entspricht der Mortalität beim Menschen ¹⁴⁶. Dies zeigt also die Vergleichbarkeit des Modells mit der tatsächlichen Pathologie beim Menschen. Genau wie beim Menschen versterben auch die Tiere nach SAB am häufigsten innerhalb der ersten 48 Stunden. Und genau hier setzte die Fragestellung an: Der Vasospasmus beim Menschen ist nach 4-7 Tagen beschrieben ^{22,101,128,194}, neurologische Defizite und die Hauptmortalität finden jedoch in den ersten 48 Stunden statt. Nun stellt sich die Frage nach der Ursache für diese Mortalität. Der Hirndruck mit anschließender Herniation des Gehirns stellt nur eine Gefahr in den ersten Minuten der Ruptur des Aneurysmas dar, da der ICP hiernach wieder unter eine kritische Schwelle sinkt. Dieses Phänomen ist wahrscheinlich für den Tod der ~15% der Patienten verantwortlich, welche nie das Krankenhaus erreichen ¹⁴⁷. Somit ist bis heute unbekannt, was genau für den Tod von ~35% der Patienten innerhalb der ersten 48 Stunden verantwortlich ist. Die Letalitätsuntersuchung zeigt also, daß mit diesem Modell wahrscheinlich verlässliche Untersuchungen über die pathophysiologischen Ursachen getätigt werden können, welche zur Mortalität und Morbidität innerhalb der ersten 48 Stunden beitragen. Direkt die Todesursache zu ermitteln war äußerst schwierig, da die Tiere meistens nachts verstarben und somit erst nach einigen Stunden einer Obduktion zugänglich waren. Durch den sehr schnellen Verwesungsprozess des Gehirns, konnte keine genaue Aussage über pathologische Veränderungen des Gehirns über die initiale SAB hinaus getätigt werden. Jedoch entstand der subjektive Eindruck, daß die Menge an Blut im Subarachnoidalraum nicht größer war als bei den Tieren, welche überlebten. Auch war der initiale ICP kein prognostischer Faktor, außer es kam zu einem fatal hohen Anstieg des ICP jenseits von 120 mmHg, was zu einer sofortigen Herniation des Hirns und dem bald darauf folgenden Tod des Tieres führte. Diese Tiere wurden aus dem Versuch genommen.

Ein Faktor, welcher zu der Mortalität nach Induktion der SAB beitragen könnte, stellt eine bakterielle Infektion dar. Aus diesem Grund wurde die Auswirkung einer antibio-

tischen Therapie auf die Mortalität nach SAB untersucht. Hier zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen, weder in Bezug auf die Gesamtmortalität, noch auf die Zeitpunkte der Mortalität. Somit ist die Mortalität höchstwahrscheinlich einzig auf die SAB selber und nicht auf eine Infektion als überlebensreduzierenden Kofaktor zurückzuführen.

Als weiteren äußerst wichtigen und auch sehr sensitiven Marker für das Outcome nach SAB wurde der Gewichtsverlauf in den ersten sieben Tagen nach SAB untersucht. Deutlich war der massive Verlust der Tiere von ~20% ihres Körpergewichtes innerhalb der ersten drei Tage. Dies ist ein Zeichen für den äußerst schlechten Allgemeinzustand der Tiere nach Induktion der SAB. Einerseits sind die Tiere in den ersten drei Tagen aufgrund ihres beinahe komatösen Zustandes fast gar nicht in der Lage, Nahrung zu sich zu nehmen, was bei der hohen Stoffwechselrate der C57/Bl6 Mäuse selbstverständlich zu einem dramatischen Gewichtsverlust führt. Darüber hinaus ist die Stoffwechselrate nach SAB noch zusätzlich erhöht^{110,116}, was im Sinne eines Circulus vitiosus die Gewichtsreduktion noch verstärkt. Hierdurch sinkt die Aktivität des Tieres und es ist somit weniger in der Lage, Nahrung zu sich zu nehmen, wodurch der Gewichtsverlust noch weiter zunimmt etc. Auch bei der Untersuchung dieses Faktors zeigten sich keine Unterschiede zwischen der Kontrollgruppe und den Tieren, welche antibiotisch therapiert wurden. Somit ist auch der Gewichtsverlust nicht auf eine bakterielle Infektion zurückzuführen, wie von anderen Arbeitsgruppen vorgeschlagen wurde³³. Jedoch scheint es so zu sein, daß es ein kritisches Mindestgewicht gibt, welches für das weitere Überleben notwendig ist. Jedesmal wenn das Körpergewicht eines Tieres unter die Grenze von 17g fiel, verstarb das Tier in der Folge.

4.2.4. Gestörte CO₂-Reaktivität und Verhalten auf Papaverin

Die pialen Widerstandsgefäße nach SAB zeigten im Gegensatz zu gesunden Gefäßen keinerlei Reaktion auf verschiedene PaCO₂. So ergab sich keinerlei Reaktivität der Gefäße unabhängig davon, ob die Hyperkapnie respiratorisch oder durch eine externe Zufuhr von Kohlendioxid ausgelöst wurde. Es war schon früher in der Literatur eine gestörte Reaktion auf CO₂ beschrieben worden^{27,29,30,63,105,160}, diese konnte jedoch noch nie direkt beobachtet werden. Auch wurden diese Phänomene bislang einzig in der Phase der bekannten Vasospasmen getätigt, d.h. frühestens 48h nach

SAB. Dass auch schon drei Stunden nach SAB keinerlei Reaktivität auf CO₂ zu verzeichnen ist war bislang nicht bekannt.

CO₂ spielt eine außerordentlich wichtige Rolle für die Homöostase des menschlichen Gehirns^{96,143}, da es neben der Autoregulation, welche die zerebrale Durchblutung zwischen mittleren arteriellen Blutdrücken von 60 mmHg bis 160 mmHg konstant hält, einer der wichtigsten Faktoren ist, welcher die Durchblutung anregt. Einfach gesagt, sorgt CO₂ für die Anpassung der zerebralen Durchblutung an die metabolische Aktivität des umgebenden Hirngewebes. CO₂ dient hierbei als Zeichen einer Unterversorgung mit Blut und sorgt durch seine gefäßdilatierende Wirkung für die Beendigung eben jenes Zustandes. Der genaue Weg, auf welchem CO₂ an den Gefäßen wirkt, ist bis heute nicht im Detail geklärt. Jedoch ist bekannt, daß die Reaktivität der Gefäße auf CO₂ abhängig ist von der Anwesenheit eines anderen äußerst potenten Vasodilatators: Stickstoffmonoxid (NO)^{71,104,105}. Bei Gabe von L-NAME, einem starken Inhibitor der NO-Synthase, welche NO im Körper aus L-Arginin synthetisiert, fällt – genau wie hier nach SAB beobachtet – der vasodilatierende Effekt einer Hyperkapnie weg¹⁵. Somit könnte dies ein Hinweis auf einen lokalen Mangel an NO am Gefäß sein. NO hat ebenfalls einen cGMP-abhängigen Wirkmechanismus, ähnlich dem von CO₂, vielleicht ist es sogar der gleiche Übertragungsweg, den beide Gase verfolgen. Beide Gase wirken jedoch auf die glatte Muskulatur über den Umweg des Endothels. Miranda et al. zeigten 1996, daß NO in Gefäßen, bei welchen künstlich das Endothel entfernt wurde, keinerlei Wirkung mehr hatte¹²⁷. Um zu klären, ob die beobachteten Effekte nach SAB auf eine Störung des Endothels oder eine Störung der glatten Muskulatur selbst zurückzuführen sind, wurde eine Papaverin-Lösung lokal in den Subarachnoidalraum appliziert. Papaverin führt – wie unter 2.3.9.4. beschrieben – zu einer direkten Relaxation glatter Muskelzellen. Hierbei gab es keinen Unterschied zwischen gesunden Kontrolltieren und solchen, welche unter einer SAB litten. Somit konnte eindeutig belegt werden, daß die pathologische Reaktivität auf CO₂ nach einer SAB auf eine Störung in der Interaktion zwischen Endothel und glatter Muskulatur zurückzuführen ist und nicht auf eine Störung der glatten Muskulatur selbst. Was genau zu dieser gestörten Interaktion führt, ob dies wirklich auf einen lokalen NO-Mangel zurückzuführen ist, oder ob vielleicht auch eine Aktivierung von Thrombozyten hierbei eine Rolle spielt (siehe Kapitel 4.2.7.), ist zum jetzigen Zeitpunkt noch völlig unklar und bedarf weiterer Untersuchungen.

4.2.5. Strahler-Schema

Um die Auswirkungen einer SAB auf die zerebralen Widerstandsgefäße und daraus folgend die Durchblutung zu untersuchen, wurden bislang in der Regel indirekte Verfahren, wie TCD, Laser-Doppler oder Radiographie verwandt. Als andere Untersuchungsmethode wurde die direkte Reaktion der Gefäße auf Blut an der abluminalen Seite meistens durch *in vitro* Versuche untersucht. Hier konnte nun erstmals mit Hilfe des Strahler-Schemas unter Mitwirkung der Intravitalmikroskopie der Gefäßdurchmesser der zerebralen, pialen Widerstandsgefäße direkt bestimmt werden. Dabei zeigte sich, daß schon drei Stunden nach Induktion der SAB der Durchmesser aller Gefäße tendenziell geringer war als bei gesunden Kontrolltieren. Besonders deutlich und statistisch signifikant war dies für Gefäße der Kategorie 3, d.h. bei Gefäßen mit einem Durchmesser von $21,9 \pm 0,8 \mu\text{m}$. Durch die Messung über die gesamte Länge der Gefäße hinweg und durch die wiederholte Messung bei sechs Tieren konnte eine lokale Erscheinung ausgeschlossen werden. Es handelt sich mit Sicherheit um ein Phänomen, welches die gesamte piale Gefäßarchitektur betrifft. Doch so stellt sich erneut die Frage nach den Ursachen für diesen Umstand. Wie unter 4.2.4. bereits erwähnt, sprechen die Daten der CO_2 -Versuche für einen lokalen NO-Mangel. NO gilt, durch die Erhöhung des intrazellulären cGMP Spiegels und die daraus folgende Aktivierung Calcium-abhängiger Kalium-Pumpen, als einer der wichtigsten Regulatoren der Gefäßweite. Byrne et al. konnten 1989 beschreiben, daß Hämoglobin auf der abluminalen Seite als potenter Vasokonstriktor wirken kann und spekulierten über eine Wirkung des Hämoglobins als „Fänger“ für NO¹⁶. Die Gruppe um Jonathan Stamler zeigte in den 90er Jahren, daß dieser Mechanismus des „Abfangens“ wahrscheinlich entweder über eine Bindung des NO an die β -Untereinheit des Hämoglobin-Moleküls oder eine Nitrosylierung von Plasmaproteinen passiert^{52,80}. Und es gibt noch weitere Hinweise für diese These. Sehba et al. zeigten, daß nach SAB die Spiegel von Nitrit und Nitrat im Liquor signifikant erniedrigt sind^{164,167,172}. NO wird im Körper in Nitrit und Nitrat umgewandelt, wodurch diese beiden Substanzen einen Hinweis auf die Menge an synthetisiertem NO geben. Jedoch nach wie vor völlig unklar ist die Frage, wie Hämoglobin, welches sich in der abluminalen Seite befindet, die Wirkung von NO auf das Endothel beeinflusst. Die wahrscheinlichste Ursache hierfür ist, daß nach Induktion der SAB über einen bis heute ungeklärten Mechanismus die Produktion von NO im Endothel zum Erliegen kommt. Hierfür spricht auch die massive Hochregulation der iNOS nach SAB¹⁶⁶, eines der drei Isoenzyme, wel-

ches NO synthetisiert. Jedoch ist nicht klar, ob die Kommunikation zwischen abluminaler Seite und Endothel direkt durch das Hämoglobin, second Messenger, die Bildung freier Radikale¹⁵⁸ oder eines gänzlich anderen Mechanismus vonstatten geht.

4.2.6. Mikrovasospasmen

Der Vasospasmus bzw. die daraus resultierende zerebrale Ischämie ist die am meisten gefürchtete Komplikation nach einer SAB. Wie bereits erwähnt, werden technisch bedingt in der Klinik jedoch nur qualitative Aussagen über den Durchmesser der großen Gefäße wie der A. cerebri media und anterior getroffen. Eine Reduktion des Gefäßdurchmessers in einem dieser Gefäße kann jedoch durch eine ausreichende Kollateralisierung weitgehend kompensiert werden.

Die Frage, ob nicht auch die kleinen Widerstandsgefäße in Form von Arteriolen von Mikrovasospasmen betroffen sind, stand immer zur Debatte^{58,79,179}. Gestützt wurde dies durch die Tatsache, daß der diagnostizierte Vasospasmus der großen Gefäße keinen positiv-prädiktiven Wert bzgl. der neurologischen Defizite aufweist. Neurologische Defizite treten aber auf, unabhängig davon ob Vasospasmen diagnostiziert wurden oder nicht. 2003 konnte von Uhl et al. erstmals der Nachweis erbracht werden, daß Mikrovasospasmen beim Menschen auftreten¹⁸⁷. Jedoch war es aufgrund des technischen Aufbaus dieser Studie nicht möglich, zu verschiedenen Zeitpunkten und an denselben Orten qualitative und quantitative Aussagen über die entstandenen Mikrovasospasmen zu treffen. Somit ergab sich die Aufgabe, für die nähere Erforschung der Mikrovasospasmen ein Tiermodell zu etablieren, um Mikrovasospasmen näher zu charakterisieren und ihre Bedeutung für die Pathologie der SAB zu bestimmen. Als drei Stunden nach Induktion der SAB das gesamte Strömungsgebiet der A. cerebri media mit Hilfe der Intravitalmikroskopie untersucht wurde, zeigten sich bei allen Tieren deutlich sichtbare Mikrovasospasmen. Die spastischen Gefäße boten eine Reduktion des Gefäßdurchmessers auf $67,4 \pm 1,1\%$ des gesunden Gefäßdurchmessers. Da nach dem Gesetz von Hagen-Poiseuille:

$$W = \frac{8 \cdot \eta \cdot l}{\pi \cdot r^4}$$

die Reduktion des Radius in der vierten Potenz den Volumenstrom reduziert, ist deutlich, daß eine solche Veränderung des Durchmessers der präkapillaren Gefäße eine Reduktion der zerebralen Durchblutung um ca. 87% nach sich zieht. Zwar zeigten nur 11 Mikrovasospasmen eine Reduktion des Durchmessers um mehr als die Hälfte der Baseline, jedoch trugen die schwächeren Mikrovasospasmen alleine durch ihre Häufigkeit sicherlich deutlich zu einer Minderperfusion einzelner Gehirnareale bei. Auffallend war jedoch die Verteilung der Stärke des Mikrovasospasmus bezogen auf die Gefäßgröße. Die kleinsten Präkapillaren zeigten hierbei mit $61,8 \pm 2,4\%$ die deutlichste Reduktion des Gefäßdurchmessers. Je größer die untersuchten Gefäße umso schwächer der Mikrovasospasmus. Dies könnte auf einen dynamischen Prozess hinweisen. Da der Makrovasospasmus bekanntermaßen i.d.R. vier Tage post-iktal nachzuweisen ist, ist vorstellbar, daß die Vasospasmen schon kurz nach dem Austritt des Blutes an den Präkapillaren quasi „generiert“ werden und sich per continuitatem entlang den Gefäßen ausbreiten, bis diese Vasospasmen schließlich mit Hilfe der TCD an den großen Gefäßen der Schädelbasis nachgewiesen werden können. Damit stellt sich erneut die Frage, über welchen Mechanismus diese Generierung vonstatten gehen soll. Und auch hier besteht die Möglichkeit einer Beteiligung von NO. Wie bereits angedeutet, wird NO im Organismus mit Hilfe eines Enzymes namens NO-Synthase gebildet. Dieses Enzym besitzt drei Isoformen: endotheliale NO-Synthase (eNOS), induzierbare NO-Synthase (iNOS) und neuronale NO-Synthase (nNOS). Unter physiologischen Bedingungen ist die iNOS beinahe gar nicht aktiviert und spielt somit auch keine größere Rolle für die Homöostase des Gehirns. Die Aufgabe der Regulation der Hirndurchblutung teilen die eNOS und die nNOS, wobei bis heute noch nicht klar ist, welches der beiden Isoenzyme hierbei den größeren Beitrag leistet^{51,68,70,182,186}. Eine Erklärungsmöglichkeit für die Entstehung der Mikrovasospasmen wäre, daß die NO Produktion - z.B. durch die Entstehung freier Radikale aus Oxyhämoglobin - gestört ist. Daten von Kim et al. sprechen für diese Möglichkeit. Diese Arbeitsgruppe konnte zeigen, daß nach einer SAB wahrscheinlich nicht die Freisetzung von NO gestört ist, sondern die Produktion von cGMP und damit auch die Signaltransduktion von NO nicht mehr wie unter physiologischen Zuständen möglich ist^{90,91}. Somit bietet die Theorie des lokalen NO-Mangels zusammen mit der gestörten CO₂-Reaktivität eine gute Erklärungsmöglichkeit für die beobachteten Mikrovasospasmen.

4.2.7. Thromben

Bei der näheren Untersuchung der Gefäße im Hinblick auf die Mikrovasospasmen, konnte festgestellt werden, daß sich in vielen Arteriolen drei Stunden nach Induktion einer SAB Thromben gebildet hatten. Insgesamt wurden 40 Thromben in 113 spastischen Gefäßen gefunden; ein Befund, dem nur 2 Thromben in 232 gesunden Gefäßen gegenüberstehen. Die Thromben waren bereits fünfzehn Minuten nach Beginn der Untersuchung, d.h. ca. 3 Stunden und 15 Minuten nach Induktion der SAB mit Hilfe des Intravitalmikroskops zu finden und nahmen über den Untersuchungszeitraum in einer linearen Beziehung zu. Nach Virchow ist die Grundlage für eine Thrombenentstehung die Trias aus „Stase, Endothelschaden und Gerinnungsstörung“. Aus dem ersten der genannten Punkte könnte man erwarten, daß die oben erwähnten Mikrovasospasmen mit ihrer sicher vorhandenen Reduktion der zerebralen Durchblutung für die Entstehung der Thromben verantwortlich sind. Jedoch zeigen die erhobenen Daten, daß es sich mit Sicherheit nicht um ein rein rheologisches Phänomen handelt. Falls es sich um ein solches handeln sollte, würde man eine Konzentration der Thrombenentstehung auf die Orte mit den stärksten Mikrovasospasmen erwarten. Doch war dies genau nicht der Fall. Die meisten Spasmen waren in Gefäßen mit einem moderaten Mikrovasospasmus angesiedelt. Dies lässt auf eine andere Komponente der Virchow-Trias als „Stase“ schließen. Welche Bedeutung die Thrombenentstehung für die Pathologie der neurologischen Defizite nach SAB haben kann, wird auch deutlich, wenn man betrachtet, wie die Thromben auf die einzelne Gefäßgrößen verteilt sind. Hierbei zeigt sich, daß ~80% der Gefäße der Kategorie 2, also der Präkapillaren, einen Thrombus aufweisen. Dies hat selbstverständlich starke Auswirkungen auf die Versorgung der distal gelegenen Hirnareale. Da kein Mechanismus bekannt ist, der in dieser Situation und in den beobachteten Gefäßen für einen Schaden am Endothel sorgen könnte, scheidet auch der zweite Faktor der Virchow-Trias als Ursache für die massiv gesteigerte Thrombenentstehung aus. Somit bleibt nur noch der Faktor der gestörten Gerinnung selbst. Bestätigt werden unsere Daten von der Arbeitsgruppe um Fatima Sehba. Diese Gruppe konnte in der Ratte zeigen, daß sich schon zehn Minuten bis 24 Stunden nach Induktion einer SAB immunhistochemisch eine deutliche Aggregation von GPIIb/IIIa-Rezeptoren nachweisen ließ¹⁶⁹. Dieser Rezeptor, der auf der Oberfläche der Thrombozyten sitzt, wird heute als der alleinige Verantwortliche für die Thrombozytenaggregation angesehen¹⁹. Wird dieser Rezeptor aktiviert, bindet er an andere Glykoproteine, Fibrinogen

und/oder den von-Willebrand Faktor ¹⁹. Somit ist eine immunhistochemische Färbung dieses Rezeptors ein probates Mittel Thrombozytenaggregate nachzuweisen. Und ein weiteres Mal stellt sich die Frage nach dem Pathomechanismus, welcher für die Thrombenentstehung verantwortlich ist. Und auch hier bietet ein lokaler NO-Mangel eine mögliche Erklärung. Radomski et al. konnten schon 1992 zeigen, daß NO ein äußerst potenter Inhibitor der Thrombozytenaggregation darstellt – sowohl *in vitro* als auch *in vivo* ¹⁴⁹. Diese Daten wurden in den folgenden Jahren häufig bestätigt. So verkürzte sich beispielsweise die Blutungszeit freiwilliger Probanden, bei denen die eNOS inhibiert wurde ¹⁷⁴, und die Beschichtung künstlicher Oberflächen mit NO-freisetzenden Polymeren verhinderte eine Thrombozytenaggregation ^{6,111}. Wie in anderen Geweben auch, wirkt NO in Thrombozyten über eine Aktivierung der Guanylatzyklase und der Phosphoinositid-3-Kinase, was neben vielen anderen Effekten unter anderem zu einer Reduktion der GPIIb/IIIa Rezeptoren an der Oberfläche der Thrombozyten führt ¹⁰⁹. Dies wäre eine direkte Erklärungsmöglichkeit für die Inhibition der Thrombozytenaggregation durch NO. Somit könnte ein lokaler NO-Mangel auch für die beobachtete verstärkte arterielle Thrombozytenaggregation verantwortlich sein.

4.2.8. Hemmung der Thrombozytenaggregation

Nachdem beobachtet wurde, daß nach Induktion der SAB vermehrt Thromben in der Mikrozirkulation entstehen, war der nächste logische Schritt, um die Pathophysiologie der frühen Phase der SAB zu verstehen, die Hemmung der Thrombozytenaggregation. Sollte die Entstehung von Mikrothromben in der Mikrozirkulation schon sehr früh nach SAB für einen Teil des entstehenden Schadens verantwortlich sein, müsste die Hemmung der Entstehung von Mikrothromben sichtbare und messbare Konsequenzen nach sich ziehen. Wie bereits im vorangehenden Abschnitt beschrieben konnten Sehba et al. 2005 eine Akkumulation von GPIIb/IIIa-Rezeptoren zeigen. Aus diesem Grund wurde im Rahmen dieser Studie ein Medikament zur Hemmung der Thrombozytenaggregation eingesetzt, welches genau am GPIIb/IIIa-Rezeptor ansetzt: Tirofiban. Dieses noch relativ neue Medikament wird seit seiner Einführung besonders in der Kardiologie sehr geschätzt und in vielen Einsatzbereichen verwendet ^{123,197}. Auch in Tiermodellen wurde Tirofiban zur Untersuchung verschiedenster Fragestellungen erfolgreich eingesetzt ^{98,161}. Deswegen wurde nun im Rahmen dieser Arbeit die Auswirkung von intraperitoneal appliziertem Tirofiban auf die Entwicklung des ICP, des LDF, des Gewichtsverlaufes und der Mortalität untersucht. Hierbei zeigten sich

keinerlei signifikante Effekte im Vergleich zu Tieren, welche mit einem Vehikel behandelt wurden. Für diesen Befund ergeben sich verschiedene Erklärungsmöglichkeiten.

Zunächst wäre vorstellbar, daß die beobachtete Entstehung von Mikrothromben nach SAB keinen wesentlichen Anteil an den pathophysiologischen Schäden nach SAB hat. Dies ist jedoch kaum vorstellbar, da die Verlegung von beinahe 1/3 der Gefäße der Mikrozirkulation, wie es in dieser Arbeit beobachtet wurde, allen Erkenntnissen die Durchblutung des Gehirnes betreffend zuwiderlaufen würde. Eine zweite Erklärungsmöglichkeit, warum die Hemmung der Thrombozytenaggregation keinen messbaren Effekt zeigte, könnte daran liegen, daß im Rahmen dieser Arbeit entweder die Parameter nur zu kurz beobachtet wurden oder vielleicht sogar die nicht relevanten Parameter gewählt wurden. Es ist denkbar, daß die Auswirkungen auf den ICP und den LDF sich erst mit Verzögerung nach der ersten Stunde bemerkbar machen. Vielleicht wirken sich die Mikrothromben auch nicht auf den ICP direkt, sondern auf die Entwicklung des sekundären Hirnödems aus. Es gibt schon seit längerer Zeit Hinweise darauf, daß die Aktivierung von Thromben durch die Freisetzung proinflammatorischer Substanzen direkt zu einer vermehrten Permeabilität der Blut-Hirnschranke führt und diesen Effekt in der Folge durch die Freisetzung von Matrix-Metalloproteinasen noch weiter verstärkt^{3,173}. Somit wäre für die Zukunft die Bestimmung des Hirnödems ein sicherlich interessanter Parameter zur Bestimmung des Schadens, der durch Mikrothromben verursacht wird. Eine letzte mögliche Hypothese, warum in dieser Studie keine Effekte durch die Gabe von Tirofiban beobachtet wurden, könnte sein, daß die thrombozytenaggregationshemmende Wirkung des Tirofiban durch einen anderen, pro-aggregatorischen Effekt verhindert wird. Und auch hier stellt der NO-Mangel wieder einen möglichen Kandidaten dar. Wie bereits oben erwähnt, ist NO ein äußerst potenter Inhibitor der Thrombozytenaggregation. Somit könnte ein lokaler NO-Mangel im Gehirn eine mangelnde Wirkung des Tirofiban erklären. Diese Theorie würde auch klären, warum es trotz mangelnder Effekte im Gehirn dennoch zu einer Verlängerung der Blutungszeit im Gehirn kommt.

5. Zusammenfassung und Ausblick

Die SAB ist eine Krankheit mit einer äußerst hohen frühen wie auch späten Mortalität und Morbidität. Die genauen Ursachen der frühen wie auch späten Effekte sind bis heute nicht zufriedenstellend geklärt. Ungefähr 35% der Patienten versterben in den ersten 48h aus bis heute nicht geklärten Gründen. Die Forschungsergebnisse der letzten Jahre zeigen jedoch deutlich, daß die Gründe hierfür wahrscheinlich auf der Ebene der Mikrozirkulation zu suchen sind. Aus diesem Grund wurden im Rahmen dieser Arbeit die Veränderungen der zerebralen, pialen Mikrozirkulation der Maus nach SAB mit Hilfe des intraluminalen Fadenmodells und durch Intravitalmikroskopie genau untersucht. Zur Induktion der SAB wurde ein monofiler Faden in der A. carotis int. eingeführt, bis an die Gabelung von MCA und ACA vorgeschoben und diese Gabelung perforiert, was der Ruptur eines intrakraniellen Aneurysma ähnelt. Anschließend wurde das Tier über dem Strömungsgebiet der linken MCA unter Schonung der Dura Mater trepaniert, der Farbstoff FITC-Dextran i.v. appliziert und somit die zerebrale Mikrozirkulation sichtbar gemacht. Hierbei zeigten sich deutliche Veränderungen im Vergleich zu gesunden Kontrolltieren. Mit Hilfe eines modifizierten Strahler-Schemas war es erstmals möglich die Gefäßarchitektur der pialen Mikrozirkulation einer gesunden C57/Bl6 genau zu charakterisieren und diese anschließend mit einem Tier zu vergleichen, bei welchem eine SAB induziert wurde. Hierbei zeigte sich, daß schon 3 Stunden nach SAB die zerebralen Gefäße stärker kontrahiert sind als bei gesunden Tieren. Auch zeigten Tiere, die eine SAB erlitten hatten, keinerlei Reaktion auf Änderungen der arteriellen CO₂-Konzentration. Gesunde Tiere reagierten wie erwartet mit einer Dilatation bzw. Konstriktion auf eine Hyper- bzw. Hypokapnie. Diese Reaktion fehlte bei Tieren nach einer SAB völlig, gleichgültig ob die Änderungen der arteriellen CO₂-Konzentration respiratorisch oder durch die exogene Zufuhr von CO₂ verursacht wurden. Dies gibt einen deutlichen Hinweis auf eine rasche Störung der Funktionsfähigkeit des arteriellen Endothels, welches für die Aufrechterhaltung der zerebralen Homöostase essentiell ist. Den wichtigsten Befund dieser Arbeit dürften jedoch die Mikrovasospasmen und die Entdeckung von arteriellen Thromben im pialen Strömungsgebiet darstellen. Vasospasmen sind ein seit langem nach SAB bekanntes Phänomen, jedoch wurden diese i.d.R. 4-7 Tage nach SAB in den großen Gefäßen des Gehirns - wie der MCA oder der ACA - beschrieben und

können aufgrund ihrer Lokalisation und aufgrund ihres mangelnden prädiktiven Wertes bzgl. der neurologischen Defizite nach SAB zu diesen Defiziten nur einen geringen Beitrag leisten. Hier konnten nun erstmals die schon lange vermuteten Mikrovasospasmen nach SAB direkt nachgewiesen und diese auch näher quantifiziert werden. Es zeigten sich in beinahe allen Gefäßen die mit Blut in Kontakt kamen 3 Stunden nach SAB deutliche segmentale oder perlschnurartige Mikrovasospasmen, welche eine Reduktion des Gefäßlumens um bis zur Hälfte nach sich ziehen. Diese haben somit sicherlich eine deutliche Reduktion des Angebots an Sauerstoff und anderen Metaboliten für das Gehirn zur Folge. Des Weiteren sind die gefundenen arteriellen Thromben, welche in großer Zahl einzig nach SAB auftraten, zusätzlich zu den Mikrovasospasmen ein weiterer Faktor, welcher die Durchblutung des Gehirns deutlich einschränkt und somit zu der Mortalität und Morbidität beiträgt. Der Grund, weswegen die Mikrovasospasmen und Thromben entstehen, ist bis heute weitestgehend unklar, jedoch lässt sich begründet vermuten, daß ein lokaler NO-Mangel als Ursache für die beobachteten Phänomene verantwortlich ist.

A. Literaturliste

1. Unruptured intracranial aneurysms--risk of rupture and risks of surgical intervention. International Study of Unruptured Intracranial Aneurysms Investigators. *N. Engl. J. Med.* **339**, 1725-1733 (1998).
2. Aaslid, R., Markwalder, T. M. & Nornes, H. Noninvasive transcranial Doppler ultrasound recording of flow velocity in basal cerebral arteries. *J. Neurosurg.* **57**, 769-774 (1982).
3. Akopov, S., Sercombe, R. & Seylaz, J. Cerebrovascular reactivity: role of endothelium/platelet/leukocyte interactions. *Cerebrovasc. Brain Metab Rev.* **8**, 11-94 (1996).
4. Ali, A. T., Montgomery, W. D., Santamore, W. P. & Spence, P. A. Preventing gastroepiploic artery spasm: papaverine vs calcium channel blockade. *J. Surg. Res.* **71**, 41-48 (1997).
5. Anderson, G. B., Findlay, J. M., Steinke, D. E. & Ashforth, R. Experience with computed tomographic angiography for the detection of intracranial aneurysms in the setting of acute subarachnoid hemorrhage. *Neurosurgery* **41**, 522-527 (1997).
6. Annich, G. M. *et al.* Reduced platelet activation and thrombosis in extracorporeal circuits coated with nitric oxide release polymers. *Crit Care Med.* **28**, 915-920 (2000).
7. Bailes, J. E., Spetzler, R. F., Hadley, M. N. & Baldwin, H. Z. Management morbidity and mortality of poor-grade aneurysm patients. *J. Neurosurg.* **72**, 559-566 (1990).
8. Barry, K. J., Gogjian, M. A. & Stein, B. M. Small animal model for investigation of subarachnoid hemorrhage and cerebral vasospasm. *Stroke* **10**, 538-541 (1979).
9. BECKER, E. *Fluoreszenzmikroskopie.* (1990).
10. Bederson, J. B., Germano, I. M. & Guarino, L. Cortical blood flow and cerebral perfusion pressure in a new noncraniotomy model of subarachnoid hemorrhage in the rat. *Stroke* **26**, 1086-1091 (1995).
11. Berra, L. V., Carcereri De, P. A., Suzuki, H. & Pasqualin, A. The role of constitutive and inducible nitric oxide synthase in the human brain after subarachnoid hemorrhage. *J. Neurosurg. Sci.* **51**, 1-9 (2007).
12. Boisvert, D. P., Pickard, J. D., Graham, D. I. & Fitch, W. Delayed effects of subarachnoid haemorrhage on cerebral metabolism and the cerebrovascular response to hypercapnia in the primate. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* **42**, 892-898 (1979).
13. Broderick, J. P., Brott, T. G., Duldner, J. E., Tomsick, T. & Leach, A. Initial and recurrent bleeding are the major causes of death following subarachnoid hemorrhage. *Stroke* **25**, 1342-1347 (1994).

14. Brussel, T., Fitch, W., Brodner, G., Arendt, I. & Van, A. H. Effects of halothane in low concentrations on cerebral blood flow, cerebral metabolism, and cerebrovascular autoregulation in the baboon. *Anesth. Analg.* **73**, 758-764 (1991).
15. Buchanan, J. E. & Phillis, J. W. The role of nitric oxide in the regulation of cerebral blood flow. *Brain Research* **610**, 248-255 (1993).
16. Byrne, J. V., Griffith, T. M., Edwards, D. H., Harrison, T. J. & Johnston, K. R. Investigation of the vasoconstrictor action of subarachnoid haemoglobin in the pig cerebral circulation in vivo. *Br. J. Pharmacol.* **97**, 669-674 (1989).
17. Claassen, J. *et al.* Global cerebral edema after subarachnoid hemorrhage: frequency, predictors, and impact on outcome. *Stroke* **33**, 1225-1232 (2002).
18. Claassen, J. *et al.* Effect of acute physiologic derangements on outcome after subarachnoid hemorrhage. *Crit Care Med.* **32**, 832-838 (2004).
19. Coller, B. S. Blood elements at surfaces: platelets. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **516**, 362-379 (1987).
20. Craven, R. Ketamine. *Anaesthesia* **62 Suppl 1**, 48-53 (2007).
21. CROMPTON, M. R. The pathogenesis of cerebral infarction following the rupture of cerebral berry aneurysms. *Brain* **87**, 491-510 (1964).
22. Crowley, R. W., Medel, R., Kassell, N. F. & Dumont, A. S. New insights into the causes and therapy of cerebral vasospasm following subarachnoid hemorrhage. *Drug Discov. Today* **13**, 254-260 (2008).
23. de Rooij, N. K., Linn, F. H., van der Plas, J. A., Algra, A. & Rinkel, G. J. Incidence of subarachnoid haemorrhage: a systematic review with emphasis on region, age, gender and time trends. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* **78**, 1365-1372 (2007).
24. Delgado, T. J., Brismar, J. & Svendgaard, N. A. Subarachnoid haemorrhage in the rat: angiography and fluorescence microscopy of the major cerebral arteries. *Stroke* **16**, 595-602 (1985).
25. Dernbach, P. D., Little, J. R., Jones, S. C. & Ebrahim, Z. Y. Altered cerebral autoregulation and CO₂ reactivity after aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Neurosurgery* **22**, 822-826 (1988).
26. Dernbach, P. D., Little, J. R., Jones, S. C. & Ebrahim, Z. Y. Altered cerebral autoregulation and CO₂ reactivity after aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Neurosurgery* **22**, 822-826 (1988).
27. Dernbach, P. D., Little, J. R., Jones, S. C. & Ebrahim, Z. Y. Altered cerebral autoregulation and CO₂ reactivity after aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Neurosurgery* **22**, 822-826 (1988).
28. Dion, J. E., Duckwiler, G. R., Vinuela, F., Martin, N. & Bentson, J. Pre-operative micro-angioplasty of refractory vasospasm secondary to subarachnoid hemorrhage. *Neuroradiology* **32**, 232-236 (1990).

29. Diringer, M. N. *et al.* Cerebrovascular CO₂ reactivity during delayed vasospasm in a canine model of subarachnoid hemorrhage. *Stroke* **22**, 367-372 (1991).
30. Diringer, M. N., Kirsch, J. R., Hanley, D. F. & Traystman, R. J. Altered cerebrovascular CO₂ reactivity following subarachnoid hemorrhage in cats. *J. Neurosurg.* **78**, 915-921 (1993).
31. Diringer, M. N., Kirsch, J. R., Hanley, D. F. & Traystman, R. J. Altered cerebrovascular CO₂ reactivity following subarachnoid hemorrhage in cats. *J. Neurosurg.* **78**, 915-921 (1993).
32. Diringer, M. N., Kirsch, J. R., Hanley, D. F. & Traystman, R. J. Altered cerebrovascular CO₂ reactivity following subarachnoid hemorrhage in cats. *J. Neurosurg.* **78**, 915-921 (1993).
33. Dirnagl, U. *et al.* Stroke-induced immunodepression: experimental evidence and clinical relevance. *Stroke* **38**, 770-773 (2007).
34. Doczi, T., Joo, F., Adam, G., Bozoky, B. & Szerdahelyi, P. Blood-brain barrier damage during the acute stage of subarachnoid hemorrhage, as exemplified by a new animal model. *Neurosurgery* **18**, 733-739 (1986).
35. Doczi, T., Joo, F., Adam, G., Bozoky, B. & Szerdahelyi, P. Blood-brain barrier damage during the acute stage of subarachnoid hemorrhage, as exemplified by a new animal model. *Neurosurgery* **18**, 733-739 (1986).
36. Dregelid, E., Heldal, K., Andersen, K. S., Stangeland, L. & Svendsen, E. Dilation of the internal mammary artery by external papaverine application to the pedicle--an improved method. *Eur. J. Cardiothorac. Surg.* **7**, 158-162 (1993).
37. Dumont, A. S. *et al.* Cerebral vasospasm after subarachnoid hemorrhage: putative role of inflammation. *Neurosurgery* **53**, 123-133 (2003).
38. Edlow, J. A. & Caplan, L. R. Avoiding pitfalls in the diagnosis of subarachnoid hemorrhage. *N. Engl. J. Med.* **342**, 29-36 (2000).
39. Ellis, E. F., Wei, E. P., Cockrell, C. S., Choi, S. & Kontos, H. A. The effect of PGF₂ alpha on in vivo cerebral arteriolar diameter in cats and rats. *Prostaglandins* **26**, 917-923 (1983).
40. Engelson, E. T., Skalak, T. C. & Schmid-Schonbein, G. W. The microvasculature in skeletal muscle. I. Arteriolar network in rat spinotrapezius muscle. *Microvasc. Res.* **30**, 29-44 (1985).
41. Erhardt, W. *Anästhesie beim Tier.* (1992).
42. Estler, C. *Pharmakologie und Toxikologie.* (2000).
43. Faraci, F. M. & Heistad, D. D. Regulation of large cerebral arteries and cerebral microvascular pressure. *Circ. Res.* **66**, 8-17 (1990).

44. Fearn, H. J. & West, G. B. Reactivity of rats to dextran. *J. Pharm. Pharmacol.* **17**, 813 (1965).
45. Ferro, M. M., Angelucci, M. E., nselmo-Franci, J. A., Canteras, N. S. & Da, C. C. Neuroprotective effect of ketamine/xylazine on two rat models of Parkinson's disease. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **40**, 89-96 (2007).
46. FLECKNELL P. *Laboratory animal anesthesia.* (1996).
47. Fodstad, H., Kelly, P. J. & Buchfelder, M. History of the cushing reflex. *Neurosurgery* **59**, 1132-1137 (2006).
48. Friedman, J. A. *et al.* Pulmonary complications of aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Neurosurgery* **52**, 1025-1031 (2003).
49. Fujii, Y. *et al.* Ultra-early rebleeding in spontaneous subarachnoid hemorrhage. *J. Neurosurg.* **84**, 35-42 (1996).
50. Fujii, Y. *et al.* Ultra-early rebleeding in spontaneous subarachnoid hemorrhage. *J. Neurosurg.* **84**, 35-42 (1996).
51. Gotoh, J. *et al.* Regional differences in mechanisms of cerebral circulatory response to neuronal activation. *Am. J. Physiol Heart Circ. Physiol* **280**, H821-H829 (2001).
52. Gow, A. J. & Stamler, J. S. Reactions between nitric oxide and haemoglobin under physiological conditions. *Nature* **391**, 169-173 (1998).
53. Grote, E. & Hassler, W. The critical first minutes after subarachnoid hemorrhage. *Neurosurgery* **22**, 654-661 (1988).
54. Grubb, R. L., Jr., Raichle, M. E., Eichling, J. O. & Gado, M. H. Effects of subarachnoid hemorrhage on cerebral blood volume, blood flow, and oxygen utilization in humans. *J. Neurosurg.* **46**, 446-453 (1977).
55. Gruber, A. *et al.* Pulmonary function and radiographic abnormalities related to neurological outcome after aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *J. Neurosurg.* **88**, 28-37 (1998).
56. Gruber, A. *et al.* Extracerebral organ dysfunction and neurologic outcome after aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Crit Care Med.* **27**, 505-514 (1999).
57. Hanash, K. A. Comparative results of goal oriented therapy for erectile dysfunction. *J. Urol.* **157**, 2135-2138 (1997).
58. Hansen-Schwartz, J. Cerebral vasospasm: a consideration of the various cellular mechanisms involved in the pathophysiology. *Neurocrit. Care* **1**, 235-246 (2004).
59. Hashi, K., Meyer, J. S., Shinmaru, S., Welch, K. M. & Teraura, T. Changes in cerebral vasomotor reactivity to CO₂ and autoregulation following experimental subarachnoid hemorrhage. *J. Neurol. Sci.* **17**, 15-22 (1972).

60. Hashi, K., Meyer, J. S., Shinmaru, S., Welch, K. M. & Teraura, T. Changes in cerebral vasomotor reactivity to CO₂ and autoregulation following experimental subarachnoid hemorrhage. *J. Neurol. Sci.* **17**, 15-22 (1972).
61. Hashi, K., Meyer, J. S., Shinmaru, S., Welch, K. M. & Teraura, T. Changes in cerebral vasomotor reactivity to CO₂ and autoregulation following experimental subarachnoid hemorrhage. *J. Neurol. Sci.* **17**, 15-22 (1972).
62. Hashi, K., Meyer, J. S., Shinmaru, S., Welch, K. M. & Teraura, T. Changes in cerebral vasomotor reactivity to CO₂ and autoregulation following experimental subarachnoid hemorrhage. *J. Neurol. Sci.* **17**, 15-22 (1972).
63. Hassler, W. & Chioffi, F. CO₂ reactivity of cerebral vasospasm after aneurysmal subarachnoid haemorrhage. *Acta Neurochir. (Wien.)* **98**, 167-175 (1989).
64. Hausmann, H., Photiadis, J. & Hetzer, R. Blood flow in the internal mammary artery after the administration of papaverine during coronary artery bypass grafting. *Tex. Heart Inst. J.* **23**, 279-283 (1996).
65. Heistad, D. D. What's new in the cerebral microcirculation? Landis Award lecture. *Microcirculation.* **8**, 365-375 (2001).
66. Hoffman, W. E., Thomas, C. & Albrecht, R. F. The effect of halothane and isoflurane on neurologic outcome following incomplete cerebral ischemia in the rat. *Anesth. Analg.* **76**, 279-283 (1993).
67. Honma, Y., Clower, B. R., Haining, J. L. & Smith, R. R. Comparison of intimal platelet accumulation in cerebral arteries in two experimental models of subarachnoid hemorrhage. *Neurosurgery* **24**, 487-490 (1989).
68. Hudetz, A. G., Shen, H. & Kampine, J. P. Nitric oxide from neuronal NOS plays critical role in cerebral capillary flow response to hypoxia. *Am. J. Physiol* **274**, H982-H989 (1998).
69. Hunt, W. E. & Hess, R. M. Surgical risk as related to time of intervention in the repair of intracranial aneurysms. *J. Neurosurg.* **28**, 14-20 (1968).
70. Iadecola, C., Pelligrino, D. A., Moskowitz, M. A. & Lassen, N. A. Nitric oxide synthase inhibition and cerebrovascular regulation. *J. Cereb. Blood Flow Metab* **14**, 175-192 (1994).
71. Iadecola, C. & Zhang, F. Nitric oxide-dependent and -independent components of cerebrovasodilation elicited by hypercapnia. *Am. J. Physiol* **266**, R546-R552 (1994).
72. Ignarro, L. J. Biosynthesis and Metabolism of Endothelium-Derived Nitric Oxide. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* **30**, 535-560 (1990).
73. Ignarro, L. J. Biosynthesis and Metabolism of Endothelium-Derived Nitric Oxide. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* **30**, 535-560 (1990).
74. Jackowski, A., Crockard, A., Burnstock, G., Russell, R. R. & Kristek, F. The time course of intracranial pathophysiological changes following experimental

subarachnoid haemorrhage in the rat. *J. Cereb. Blood Flow Metab* **10**, 835-849 (1990).

75. Jakobsen, M., Enevoldsen, E. & Bjerre, P. Cerebral blood flow and metabolism following subarachnoid haemorrhage: cerebral oxygen uptake and global blood flow during the acute period in patients with SAH. *Acta Neurol. Scand.* **82**, 174-182 (1990).
76. Jakobsen, M., Enevoldsen, E. & Dalager, T. Spasm index in subarachnoid haemorrhage: consequences of vasospasm upon cerebral blood flow and oxygen extraction. *Acta Neurol. Scand.* **82**, 311-320 (1990).
77. Jakubowski, J., Bell, B. A., Symon, L., Zawirski, M. B. & Francis, D. M. A primate model of subarachnoid hemorrhage: change in regional cerebral blood flow, autoregulation carbon dioxide reactivity, and central conduction time. *Stroke* **13**, 601-611 (1982).
78. Jakubowski, J., Bell, B. A., Symon, L., Zawirski, M. B. & Francis, D. M. A primate model of subarachnoid hemorrhage: change in regional cerebral blood flow, autoregulation carbon dioxide reactivity, and central conduction time. *Stroke* **13**, 601-611 (1982).
79. Janjua, N. & Mayer, S. A. Cerebral vasospasm after subarachnoid hemorrhage. *Curr. Opin. Crit Care* **9**, 113-119 (2003).
80. Jia, L., Bonaventura, C., Bonaventura, J. & Stamler, J. S. S-nitrosohaemoglobin: a dynamic activity of blood involved in vascular control. *Nature* **380**, 221-226 (1996).
81. Jiang, Z. L., Kassab, G. S. & Fung, Y. C. Diameter-defined Strahler system and connectivity matrix of the pulmonary arterial tree. *J Appl. Physiol* **76**, 882-892 (1994).
82. Johshita, H., Kassell, N. F., Sasaki, T. & Ogawa, H. Impaired capillary perfusion and brain edema following experimental subarachnoid hemorrhage: a morphometric study. *J. Neurosurg.* **73**, 410-417 (1990).
83. Juvela, S., Hillbom, M. & Kaste, M. Platelet thromboxane release and delayed cerebral ischemia in patients with subarachnoid hemorrhage. *J. Neurosurg.* **74**, 386-392 (1991).
84. Juvela, S., Kaste, M. & Hillbom, M. Platelet thromboxane release after subarachnoid hemorrhage and surgery. *Stroke* **21**, 566-571 (1990).
85. Juvela, S., Kaste, M. & Hillbom, M. Platelet thromboxane release after subarachnoid hemorrhage and surgery. *Stroke* **21**, 566-571 (1990).
86. Juvela, S., Ohman, J., Servo, A., Heiskanen, O. & Kaste, M. Angiographic vasospasm and release of platelet thromboxane after subarachnoid hemorrhage. *Stroke* **22**, 451-455 (1991).
87. Kassab, G. S., Lin, D. H. & Fung, Y. C. Morphometry of pig coronary venous system. *Am. J. Physiol* **267**, H2100-H2113 (1994).

88. Kassell, N. F., Helm, G., Simmons, N., Phillips, C. D. & Cail, W. S. Treatment of cerebral vasospasm with intra-arterial papaverine. *J. Neurosurg.* **77**, 848-852 (1992).
89. Kataoka, H., Kim, S. W. & Plesnila, N. Leukocyte-endothelium interactions during permanent focal cerebral ischemia in mice. *J. Cereb. Blood Flow Metab* **24**, 668-676 (2004).
90. Kim, P., Lorenz, R. R., Sundt, T. M., Jr. & Vanhoutte, P. M. Release of endothelium-derived relaxing factor after subarachnoid hemorrhage. *J. Neurosurg.* **70**, 108-114 (1989).
91. Kim, P., Schini, V. B., Sundt, T. M., Jr. & Vanhoutte, P. M. Reduced production of cGMP underlies the loss of endothelium-dependent relaxations in the canine basilar artery after subarachnoid hemorrhage. *Circ. Res.* **70**, 248-256 (1992).
92. Koenig, H. M., Pelligrino, D. A. & Albrecht, R. F. Halothane vasodilation and nitric oxide in rat pial vessels. *J. Neurosurg. Anesthesiol.* **5**, 264-271 (1993).
93. Koerner, I. P. & Brambrink, A. M. Brain protection by anesthetic agents. *Curr. Opin. Anaesthesiol.* **19**, 481-486 (2006).
94. Koller, A., Dawant, B., Liu, A., Popel, A. S. & Johnson, P. C. Quantitative analysis of arteriolar network architecture in cat sartorius muscle. *Am. J. Physiol* **253**, H154-H164 (1987).
95. Komotar, R. J., Zacharia, B. E., Valhora, R., Mocco, J. & Connolly, E. S., Jr. Advances in vasospasm treatment and prevention. *J. Neurol. Sci.* **261**, 134-142 (2007).
96. Kontos, H. A., Wei, E. P., Raper, A. J. & Patterson, J. L., Jr. Local mechanism of CO₂ action of cat pial arterioles. *Stroke* **8**, 226-229 (1977).
97. Kreiter, K. T. *et al.* Predictors of cognitive dysfunction after subarachnoid hemorrhage. *Stroke* **33**, 200-208 (2002).
98. Kupatt, C. *et al.* Molecular mechanisms of platelet-mediated leukocyte recruitment during myocardial reperfusion. *J. Leukoc. Biol.* **72**, 455-461 (2002).
99. Kuyama, H., Ladds, A., Branston, N. M., Nitta, M. & Symon, L. An experimental study of acute subarachnoid haemorrhage in baboons: changes in cerebral blood volume, blood flow, electrical activity and water content. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* **47**, 354-364 (1984).
100. Kwak, R., Niizuma, H., Ohi, T. & Suzuki, J. Angiographic study of cerebral vasospasm following rupture of intracranial aneurysms: Part I. Time of the appearance. *Surg. Neurol.* **11**, 257-262 (1979).
101. Kwak, R., Niizuma, H., Ohi, T. & Suzuki, J. Angiographic study of cerebral vasospasm following rupture of intracranial aneurysms: Part I. Time of the appearance. *Surg. Neurol.* **11**, 257-262 (1979).

102. Lacy, P. S. & Earle, A. M. A correlation between multiple unit activity in the hypothalamus and electrocardiographic changes during a subarachnoid hemorrhage. *Brain Res.* **373**, 146-152 (1986).
103. Lapi, D., Marchiafava, P. L. & Colantuoni, A. Pial Microvascular Responses to Transient Bilateral Common Carotid Artery Occlusion: Effects of Hypertonic Glycerol. *J Vasc. Res.* **45**, 89-102 (2007).
104. Lavi, S., Egbarya, R., Lavi, R. & Jacob, G. Role of Nitric Oxide in the Regulation of Cerebral Blood Flow in Humans: Chemoregulation Versus Mechanoregulation. *Circulation* **107**, 1901-1905 (2003).
105. Lavi, S., Gaitini, D., Milloul, V. & Jacob, G. Impaired cerebral CO₂ vasoreactivity: association with endothelial dysfunction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **291**, H1856-H1861 (2006).
106. Le Roux, P. D., Elliott, J. P., Newell, D. W., Grady, M. S. & Winn, H. R. Predicting outcome in poor-grade patients with subarachnoid hemorrhage: a retrospective review of 159 aggressively managed cases. *J. Neurosurg.* **85**, 39-49 (1996).
107. Lee, K. H., Lukovits, T. & Friedman, J. A. "Triple-H" therapy for cerebral vasospasm following subarachnoid hemorrhage. *Neurocrit. Care* **4**, 68-76 (2006).
108. Leon-Carrion, J., Dominguez-Morales, M. R., Martin, J. M. & Murillo-Cabezas, F. Epidemiology of traumatic brain injury and subarachnoid hemorrhage. *Pituitary.* **8**, 197-202 (2005).
109. Loscalzo, J. Nitric oxide insufficiency, platelet activation, and arterial thrombosis. *Circ. Res.* **88**, 756-762 (2001).
110. Losiniecki, A. & Zuccarello, M. Subarachnoid hemorrhage: effect on cerebral blood flow and cerebral metabolism. *Front Biosci.* **13**, 1845-1856 (2008).
111. Maalej, N., Albrecht, R., Loscalzo, J. & Folts, J. D. The potent platelet inhibitory effects of S-nitrosated albumin coating of artificial surfaces. *J. Am. Coll. Cardiol.* **33**, 1408-1414 (1999).
112. Macdonald, R. L., Pluta, R. M. & Zhang, J. H. Cerebral vasospasm after subarachnoid hemorrhage: the emerging revolution. *Nat. Clin. Pract. Neurol.* **3**, 256-263 (2007).
113. Macdonald, R. L. *et al.* Mechanism of cerebral vasospasm following subarachnoid hemorrhage in monkeys. *Can. J. Neurol. Sci.* **19**, 419-427 (1992).
114. Macdonald, R. L. *et al.* Etiology of cerebral vasospasm in primates. *J. Neurosurg.* **75**, 415-424 (1991).
115. Marbacher, S., Neuschmelting, V., Graupner, T., Jakob, S. M. & Fandino, J. Prevention of delayed cerebral vasospasm by continuous intrathecal infusion of glyceroltrinitrate and nimodipine in the rabbit model in vivo. *Intensive Care Med.* (2008).

116. Marzatico, F. *et al.* Experimental subarachnoid hemorrhage. Lipid peroxidation and Na⁺,K⁽⁺⁾-ATPase in different rat brain areas. *Mol. Chem. Neuropathol.* **11**, 99-107 (1989).
117. Marzatico, F. *et al.* Experimental subarachnoid hemorrhage. Lipid peroxidation and Na⁺,K⁽⁺⁾-ATPase in different rat brain areas. *Mol. Chem. Neuropathol.* **11**, 99-107 (1989).
118. Matsuda, M., Shiino, A. & Handa, J. Sequential changes of cerebral blood flow after aneurysmal subarachnoid haemorrhage. *Acta Neurochir. (Wien.)* **105**, 98-106 (1990).
119. Megyesi, J. F., Vollrath, B., Cook, D. A. & Findlay, J. M. In vivo animal models of cerebral vasospasm: a review. *Neurosurgery* **46**, 448-460 (2000).
120. Megyesi, J. F., Vollrath, B., Cook, D. A. & Findlay, J. M. In vivo animal models of cerebral vasospasm: a review. *Neurosurgery* **46**, 448-460 (2000).
121. Mendelow, A. D. *et al.* Cerebrovascular reactivity and metabolism after subarachnoid hemorrhage in baboons. *Stroke* **12**, 58-65 (1981).
122. Mendelow, A. D. *et al.* Cerebrovascular reactivity and metabolism after subarachnoid hemorrhage in baboons. *Stroke* **12**, 58-65 (1981).
123. Menozzi, A., Merlini, P. A. & Ardissino, D. Tirofiban in acute coronary syndromes. *Expert. Rev. Cardiovasc. Ther.* **3**, 193-206 (2005).
124. Michenfelder, J. D. & Milde, J. H. Influence of anesthetics on metabolic, functional and pathological responses to regional cerebral ischemia. *Stroke* **6**, 405-410 (1975).
125. Miller, F. N., Sims, D. E., Schuschke, D. A. & Abney, D. L. Differentiation of light-dye effects in the microcirculation. *Microvasc. Res.* **44**, 166-184 (1992).
126. Mion, G. *et al.* Neuroprotective and antiepileptic activities of ketamine in nerve agent poisoning. *Anesthesiology* **98**, 1517-1518 (2003).
127. Miranda, F. J. *et al.* Modulatory role of endothelial and nonendothelial nitric oxide in 5-hydroxytryptamine-induced contraction in cerebral arteries after subarachnoid hemorrhage. *Neurosurgery* **39**, 998-1003 (1996).
128. Nagai, H., Noda, S. & Mabe, H. Experimental cerebral vasospasm. Part 2: effects of vasoactive drugs and sympathectomy on early and late spasm. *J. Neurosurg.* **42**, 420-428 (1975).
129. Nagai, H., Suzuki, Y., Sugiura, M., Noda, S. & Mabe, H. Experimental cerebral vasospasm. 1: Factors contributing to early spasm. *J. Neurosurg.* **41**, 285-292 (1974).
130. Naidech, A. M. *et al.* Cardiac troponin elevation, cardiovascular morbidity, and outcome after subarachnoid hemorrhage. *Circulation* **112**, 2851-2856 (2005).

131. Nakajima, Y. *et al.* Computerized tomography angiography of ruptured cerebral aneurysms: factors affecting time to maximum contrast concentration. *J. Neurosurg.* **88**, 663-669 (1998).
132. Noguchi, K. *et al.* Subacute and chronic subarachnoid hemorrhage: diagnosis with fluid-attenuated inversion-recovery MR imaging. *Radiology* **203**, 257-262 (1997).
133. Nordsletten, D. A., Blackett, S., Bentley, M. D., Ritman, E. L. & Smith, N. P. Structural morphology of renal vasculature. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **291**, H296-H309 (2006).
134. Nornes, H. Cerebral arterial flow dynamics during aneurysm haemorrhage. *Acta Neurochir. (Wien.)* **41**, 39-48 (1978).
135. Nyberg-Hansen, R., Torvik, A. & Bhatia, R. On the pathology of experimental hydrocephalus. *Brain Res.* **95**, 343-350 (1975).
136. Ohkuma, H., Itoh, K., Shibata, S. & Suzuki, S. Morphological changes of intraparenchymal arterioles after experimental subarachnoid hemorrhage in dogs. *Neurosurgery* **41**, 230-235 (1997).
137. Ohkuma, H., Manabe, H., Tanaka, M. & Suzuki, S. Impact of cerebral microcirculatory changes on cerebral blood flow during cerebral vasospasm after aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Stroke* **31**, 1621-1627 (2000).
138. Ohkuma, H., Ogane, K., Fujita, S., Manabe, H. & Suzuki, S. Impairment of anti-platelet-aggregating activity of endothelial cells after experimental subarachnoid hemorrhage. *Stroke* **24**, 1541-1545 (1993).
139. Osuka, K. *et al.* Interleukin-6 and development of vasospasm after subarachnoid haemorrhage. *Acta Neurochir. (Wien.)* **140**, 943-951 (1998).
140. Page, K. B. *et al.* Bilirubin, ferritin, D-dimers and erythrophages in the cerebrospinal fluid of patients with suspected subarachnoid haemorrhage but negative computed tomography scans. *J. Clin. Pathol.* **47**, 986-989 (1994).
141. Parekh, N. *et al.* Cardiac troponin I predicts myocardial dysfunction in aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *J. Am. Coll. Cardiol.* **36**, 1328-1335 (2000).
142. Parra, A. *et al.* Mouse model of subarachnoid hemorrhage associated cerebral vasospasm: methodological analysis. *Neurol. Res.* **24**, 510-516 (2002).
143. Peebles, K. *et al.* Human cerebrovascular and ventilatory CO₂ reactivity to end-tidal, arterial and internal jugular vein PCO₂. *J Physiol* **584**, 347-357 (2007).
144. Piepgras, A., Thome, C. & Schmiedek, P. Characterization of an anterior circulation rat subarachnoid hemorrhage model. *Stroke* **26**, 2347-2352 (1995).
145. Pobereskin, L. H. Incidence and outcome of subarachnoid haemorrhage: a retrospective population based study. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* **70**, 340-343 (2001).

146. Pobereskin, L. H. Incidence and outcome of subarachnoid haemorrhage: a retrospective population based study. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* **70**, 340-343 (2001).
147. Pobereskin, L. H. Incidence and outcome of subarachnoid haemorrhage: a retrospective population based study. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* **70**, 340-343 (2001).
148. Pollick, C., Cujec, B., Parker, S. & Tator, C. Left ventricular wall motion abnormalities in subarachnoid hemorrhage: an echocardiographic study. *J. Am. Coll. Cardiol.* **12**, 600-605 (1988).
149. Radomski, M. W., Rees, D. D., Dutra, A. & Moncada, S. S-nitroso-glutathione inhibits platelet activation in vitro and in vivo. *Br. J. Pharmacol.* **107**, 745-749 (1992).
150. Rainsford, K. D. Anti-inflammatory drugs in the 21st century. *Subcell. Biochem.* **42**, 3-27 (2007).
151. Ram, Z., Sahar, A. & Hadani, M. Vasospasm due to massive subarachnoid haemorrhage--a rat model. *Acta Neurochir. (Wien.)* **110**, 181-184 (1991).
152. Rasmussen, G., Hauerberg, J., Waldemar, G., Gjerris, F. & Juhler, M. Cerebral blood flow autoregulation in experimental subarachnoid haemorrhage in rat. *Acta Neurochir. (Wien.)* **119**, 128-133 (1992).
153. ROBERTSON, E. G. Cerebral lesions due to intracranial aneurysms. *Brain* **72**, 150-185 (1949).
154. Rovainen, C. M., Woolsey, T. A., Blocher, N. C., Wang, D. B. & Robinson, O. F. Blood flow in single surface arterioles and venules on the mouse somatosensory cortex measured with videomicroscopy, fluorescent dextrans, nonoccluding fluorescent beads, and computer-assisted image analysis. *J. Cereb. Blood Flow Metab* **13**, 359-371 (1993).
155. Rovainen, C. M., Woolsey, T. A., Blocher, N. C., Wang, D. B. & Robinson, O. F. Blood flow in single surface arterioles and venules on the mouse somatosensory cortex measured with videomicroscopy, fluorescent dextrans, nonoccluding fluorescent beads, and computer-assisted image analysis. *J. Cereb. Blood Flow Metab* **13**, 359-371 (1993).
156. Rutgers, H. C., Stepien, R. L., Elwood, C. M., Simpson, K. W. & Batt, R. M. Enrofloxacin treatment of gram-negative infections. *Vet. Rec.* **135**, 357-359 (1994).
157. Sayama, T. *et al.* High incidence of hyponatremia in patients with ruptured anterior communicating artery aneurysms. *Neurol. Res.* **22**, 151-155 (2000).
158. Sayama, T., Suzuki, S. & Fukui, M. Expression of inducible nitric oxide synthase in rats following subarachnoid hemorrhage. *Neurol. Res.* **20**, 79-84 (1998).

159. Schmid-Elsaesser, R., Zausinger, S., Hungerhuber, E., Baethmann, A. & Reulen, H. J. A critical reevaluation of the intraluminal thread model of focal cerebral ischemia: evidence of inadvertent premature reperfusion and subarachnoid hemorrhage in rats by laser-Doppler flowmetry. *Stroke* **29**, 2162-2170 (1998).
160. Schmieder, K., Jarus-Dziedzic, K., Wronski, J. & Harders, A. CO₂ reactivity in patients after subarachnoid haemorrhage. *Acta Neurochir. (Wien.)* **139**, 1038-1041 (1997).
161. Schmitt-Sody, M. *et al.* Selective inhibition of platelets by the GPIIb/IIIa receptor antagonist Tirofiban reduces leukocyte-endothelial cell interaction in murine antigen-induced arthritis. *Inflamm. Res.* **56**, 414-420 (2007).
162. Schwartz, A. Y., Masago, A., Sehba, F. A. & Bederson, J. B. Experimental models of subarachnoid hemorrhage in the rat: a refinement of the endovascular filament model. *J. Neurosci. Methods* **96**, 161-167 (2000).
163. Schwartz, A. Y., Masago, A., Sehba, F. A. & Bederson, J. B. Experimental models of subarachnoid hemorrhage in the rat: a refinement of the endovascular filament model. *J. Neurosci. Methods* **96**, 161-167 (2000).
164. Schwartz, A. Y., Sehba, F. A. & Bederson, J. B. Decreased nitric oxide availability contributes to acute cerebral ischemia after subarachnoid hemorrhage. *Neurosurgery* **47**, 208-214 (2000).
165. Schwarz, M. *et al.* Conformation-specific blockade of the integrin GPIIb/IIIa: a novel antiplatelet strategy that selectively targets activated platelets. *Circ. Res.* **99**, 25-33 (2006).
166. Sehba, F. A., Chereshnev, I., Maayani, S., Friedrich, V., Jr. & Bederson, J. B. Nitric oxide synthase in acute alteration of nitric oxide levels after subarachnoid hemorrhage. *Neurosurgery* **55**, 671-677 (2004).
167. Sehba, F. A., Ding, W. H., Chereshnev, I. & Bederson, J. B. Effects of S-nitrosoglutathione on acute vasoconstriction and glutamate release after subarachnoid hemorrhage. *Stroke* **30**, 1955-1961 (1999).
168. Sehba, F. A., Mostafa, G., Friedrich, V., Jr. & Bederson, J. B. Acute microvascular platelet aggregation after subarachnoid hemorrhage. *J. Neurosurg.* **102**, 1094-1100 (2005).
169. Sehba, F. A., Mostafa, G., Friedrich, V., Jr. & Bederson, J. B. Acute microvascular platelet aggregation after subarachnoid hemorrhage. *J. Neurosurg.* **102**, 1094-1100 (2005).
170. Sehba, F. A., Mostafa, G., Knopman, J., Friedrich, V., Jr. & Bederson, J. B. Acute alterations in microvascular basal lamina after subarachnoid hemorrhage. *J. Neurosurg.* **101**, 633-640 (2004).

171. Sehba, F. A., Mostafa, G., Knopman, J., Friedrich, V., Jr. & Bederson, J. B. Acute alterations in microvascular basal lamina after subarachnoid hemorrhage. *J. Neurosurg.* **101**, 633-640 (2004).
172. Sehba, F. A., Schwartz, A. Y., Chereshev, I. & Bederson, J. B. Acute decrease in cerebral nitric oxide levels after subarachnoid hemorrhage. *J. Cereb. Blood Flow Metab* **20**, 604-611 (2000).
173. Sercombe, R., Dinh, Y. R. & Gomis, P. Cerebrovascular inflammation following subarachnoid hemorrhage. *Jpn. J. Pharmacol.* **88**, 227-249 (2002).
174. Simon, D. I. *et al.* Effect of nitric oxide synthase inhibition on bleeding time in humans. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **26**, 339-342 (1995).
175. Smith, A. L., Larson, C. P., Jr. & Hoff, J. T. Effects of halothane on regional cerebral blood flow in experimental focal ischemia. *Anesthesiology* **39**, 377-381 (1973).
176. Smith, S. L., Scherch, H. M. & Hall, E. D. Protective effects of tirilazad mesylate and metabolite U-89678 against blood-brain barrier damage after subarachnoid hemorrhage and lipid peroxidative neuronal injury. *J. Neurosurg.* **84**, 229-233 (1996).
177. Solenski, N. J. *et al.* Medical complications of aneurysmal subarachnoid hemorrhage: a report of the multicenter, cooperative aneurysm study. Participants of the Multicenter Cooperative Aneurysm Study. *Crit Care Med.* **23**, 1007-1017 (1995).
178. Solomon, R. A., Antunes, J. L., Chen, R. Y., Bland, L. & Chien, S. Decrease in cerebral blood flow in rats after experimental subarachnoid hemorrhage: a new animal model. *Stroke* **16**, 58-64 (1985).
179. Stein, S. C., Levine, J. M., Nagpal, S. & LeRoux, P. D. Vasospasm as the sole cause of cerebral ischemia: how strong is the evidence? *Neurosurg. Focus.* **21**, E2 (2006).
180. Strahler, A. N. GEOMORPHIC SIGNIFICANCE OF VALLEYS AND PARKS OF THE KAIBAB AND COCONINO PLATEAUS, ARIZONA. *Science* **100**, 219-220 (1944).
181. Suzuki, H. *et al.* Heme oxygenase-1 gene induction as an intrinsic regulation against delayed cerebral vasospasm in rats. *J. Clin. Invest* **104**, 59-66 (1999).
182. Tanaka, K. Is nitric oxide really important for regulation of the cerebral circulation? Yes or no? *Keio J. Med.* **45**, 14-27 (1996).
183. Teasdale, G. M. *et al.* A universal subarachnoid hemorrhage scale: report of a committee of the World Federation of Neurosurgical Societies. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* **51**, 1457 (1988).
184. Tomida, M., Muraki, M., Uemura, K. & Yamasaki, K. Plasma concentrations of brain natriuretic peptide in patients with subarachnoid hemorrhage. *Stroke* **29**, 1584-1587 (1998).

185. Toroczka, Z. Topological classification of binary trees using the Horton-Strahler index. *Phys. Rev. E. Stat. Nonlin. Soft. Matter Phys.* **65**, 016130 (2002).
186. Uetsuka, S., Fujisawa, H., Yasuda, H., Shima, H. & Suzuki, M. Severe cerebral blood flow reduction inhibits nitric oxide synthesis. *J. Neurotrauma* **19**, 1105-1116 (2002).
187. Uhl, E., Lehmberg, J., Steiger, H. J. & Messmer, K. Intraoperative detection of early microvasospasm in patients with subarachnoid hemorrhage by using orthogonal polarization spectral imaging. *Neurosurgery* **52**, 1307-1315 (2003).
188. Uylings, H. B., Smit, G. J. & Veltman, W. A. Ordering methods in quantitative analysis of branching structures of dendritic trees. *Adv. Neurol.* **12**, 347-354 (1975).
189. van Son, J. A., Tavilla, G. & Noyez, L. Detrimental sequelae on the wall of the internal mammary artery caused by hydrostatic dilation with diluted papaverine solution. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* **104**, 972-976 (1992).
190. Vancutsem, P. M. & Babish, J. G. Effects of ciprofloxacin and enrofloxacin on zoxazolamine kinetics, plasma concentration and sleeping times in mice. *Toxicol. Lett.* **69**, 1-14 (1993).
191. Weir, B., Grace, M., Hansen, J. & Rothberg, C. Time course of vasospasm in man. *J. Neurosurg.* **48**, 173-178 (1978).
192. Weir, B., Grace, M., Hansen, J. & Rothberg, C. Time course of vasospasm in man. *J. Neurosurg.* **48**, 173-178 (1978).
193. Weir, B., Grace, M., Hansen, J. & Rothberg, C. Time course of vasospasm in man. *J. Neurosurg.* **48**, 173-178 (1978).
194. Weir, B., Grace, M., Hansen, J. & Rothberg, C. Time course of vasospasm in man. *J. Neurosurg.* **48**, 173-178 (1978).
195. Wijdicks, E. F. *et al.* Volume depletion and natriuresis in patients with a ruptured intracranial aneurysm. *Ann. Neurol.* **18**, 211-216 (1985).
196. Winder, S. J., Allen, B. G., Clement-Chomienne, O. & Walsh, M. P. Regulation of smooth muscle actin-myosin interaction and force by calponin. *Acta Physiol Scand.* **164**, 415-426 (1998).
197. Winter, J. P. & Juergens, C. P. The role of tirofiban in the management of coronary artery disease. *Cardiovasc. Hematol. Disord. Drug Targets.* **8**, 138-146 (2008).
198. Wolfe, C. D. *et al.* Variations in stroke incidence and survival in 3 areas of Europe. European Registries of Stroke (EROS) Collaboration. *Stroke* **31**, 2074-2079 (2000).
199. Zausinger, S., Baethmann, A. & Schmid-Elsaesser, R. Anesthetic methods in rats determine outcome after experimental focal cerebral ischemia: mechani-

cal ventilation is required to obtain controlled experimental conditions. *Brain Res. Brain Res. Protoc.* **9**, 112-121 (2002).

200. Zuurbier, C. J., Emons, V. M. & Ince, C. Hemodynamics of anesthetized ventilated mouse models: aspects of anesthetics, fluid support, and strain. *Am. J. Physiol Heart Circ. Physiol* **282**, H2099-H2105 (2002).

B. Danksagung

Ich möchte mich ganz herzlich bei Prof. Dr. med. U. Pohl für die Aufnahme in das Walter-Brendel-Zentrum für experimentelle Medizin bedanken.

Herr Prof. Dr. med. N. Plesnila schulde ich meine tiefste Dankbarkeit, nicht nur für die Überlassung des Themas dieser Dissertation und die allzeit tatkräftige Hilfe bei allen Problemen, die im Laufe der Arbeit auftraten, sondern auch und ganz besonders für die ausgezeichnete persönliche Betreuung. Diese Betreuung bezog sich nicht nur auf die Durchführung der Experimente und die Erstellung der Arbeit, sondern schulte das eigene wissenschaftliche Denken, lehrte mich das kritische Hinterfragen von Fakten und schaffte es immer eine angenehme und freundschaftliche Atmosphäre innerhalb der Arbeitsgruppe zu schaffen.

Eine wichtige Hilfe bei allen kleinen und großen Katastrophen des Laboralltags waren die technischen Assistentinnen Uta Mamrak und Irina Eskina und all die anderen Mitarbeiter des ICF, ganz besonders Dr. J. Peters und die Seele des Instituts Herr Müller. Ihnen allen gebührt mein herzlichster Dank.

Sehr großen Dank verdienen auch alle meine Mitdoktoranden, sowie die Assistenten, welche mich in die Methoden eingewiesen haben, immer mit Rat und Tat zur Seite standen und mich während schwieriger Phasen der Experimente immer wieder aufs Neue motivierten.

Auch allen meinen Freunden gegenüber empfinde ich tiefste Dankbarkeit, da Sie mich immer wieder in allen schwierigen Phasen ablenken und erneut motivieren konnten.

Den allergrößten Dank schulde ich jedoch meiner Familie.

Allen voran hat mich meine Mutter mein Leben lang in allen meinen Entscheidungen aus vollen Kräften und mit aller Liebe unterstützt und mir somit erst ermöglicht der Mensch zu werden, der ich heute bin, sowie dieses Studium und diese Dissertation zu absolvieren. Dafür kann ich ihr niemals genug danken.

Nonna und Nonno standen mir immer zur Seite und haben mich intellektuell, emotional und moralisch gefordert und gefördert. Sie haben immer an mich geglaubt und mir in jeder Situation geholfen.

Mein Vater, der aus der Ferne ein Vorbild und Lehrer und aus der Nähe ein Freund und Unterstützer ist. Der mich in allen persönlichen Schwierigkeiten beraten und gefördert hat.

Allen anderen Mitgliedern meiner Familie, die mich moralisch und persönlich unterstützt und beraten haben, gebührt mein tief empfundener, immerwährender Dank.

Und dir Nadin, möchte und muss ich danken für jeden gemeinsamen Moment.

C. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Benjamin Friedrich

Geburtsdatum: 30. August 1983

Geburtsort: Capri, Italien

Ausbildung

10/2003 – 11/2009 **Ludwig-Maximilians-Universität**

Studium der Humanmedizin

08/2005 **1. Abschnitt der ärztlichen Prüfung**

08/1994 – 07/2003 **Berthold-Gymnasium, Freiburg**

Abschluss: Abitur (Leistungskurse Chemie, Mathematik)

Praktisches Jahr

03/2009 – 07/2009 **Innere Medizin**, Städtisches Krankenhaus München Harlaching

02/2009 – 03/2009 **Neurochirurgie**, Neurochirurgische Klinik und Poliklinik, Universitätsklinikum Großhadern

12/2008 – 02/2009 **Allgemeinchirurgie**, Beaumont Hospital, Dublin, Irland

08/2008 – 12/2008 **Neurologie**, Städtisches Krankenhaus München Harlaching

Famulaturen

- 03/2008 **Neurochirurgie**, Neurochirurgische Klinik, Universitätsklinikum Ulm
(Standort Günzburg)
- 08/2007 – 09/2007 **Gynäkologie/Geburtshilfe/Pädiatrie**, St. Anne's Hospital, Nkhotakota,
Malawi
- 03/2007 **Neurochirurgie**, Neurochirurgie Innenstadt München
(Praxis Dr. Schröder/Dr. Kestlmeier/Hohmann)
- 07/2006 **Kardiologie**, Medizinische Klinik I, Universitätsklinikum Großhadern

Beruf

- 02/2010 – 06/2010 **Post-Doc**, Royal College of Surgeons, Dublin, Irland
- 06/2010 **Assistenzarzt**, Neurochirurgische Klinik und Poliklinik, Klinikum
Rechts der Isar