

Aus der Neurochirurgischen Klinik
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. Hans-Jakob Steiger

**Untersuchung zum neuroprotektiven Effekt von
Vascular Endothelial Growth Factor im
Subarachnoidalblutungsmodell der Ratte**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin der
Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Moritz Hoppe

2014

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez. Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Windolf

Dekan

Referent: Prof. Dr. med. Hänggi

Korreferent: Prof. Dr. med. Jander

-Für meine Familie-

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Sven Oliver Eicker, Moritz Hoppe, Nima Etminan, et al., "The Impact of Experimental Preconditioning Using Vascular Endothelial Growth Factor in Stroke and Subarachnoid Hemorrhage," *Stroke Research and Treatment*, vol. 2013, Article ID 948783, 7 pages, 2013. doi:10.1155/2013/94878

I. Abkürzungsverzeichnis

3D	Dreidimensional
A.	<i>Arteria</i>
AEC	3-Amino-9-Ethylcarbazol
Ant.	Anterior
CBF	Zerebraler Blutfluss
cCT	Kraniale Computertomographie
CT	Computertomographie
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSA	Digitale Subtraktionsangiographie
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
GCS	<i>Glasgow Coma Scale</i>
HE	Hämatoxylin-Eosin
HIF	Hypoxie Inducable Factor
Ig G	Immunglobulin G
LB-Medium	<i>Lysogenic Broth Medium</i>
LTR	<i>Long Terminal Repeats</i>
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
MRT	Magnetresonanztomographie
N.	Nervus
NaCl	Natriumchlorid
NO	Stickstoffmonoxid
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
pCT	Perfusions Computertomographie
ROI	<i>Region Of Interest</i>
SAB	Subarachnoidalblutung
TCD	Transkranielle Doppler Sonographie
tMCAO	<i>transient Middle Cerebral Artery Occlusion</i>
TUNEL	<i>TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling</i>

TVA	Tierversuchsanstalt
UV	Ultraviolett
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
ZNS	Zentrales Nervensystem

II. Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es zu untersuchen, welchen Effekt die intramuskuläre Applikation von VEGF Plasmiden im „*double haemorrhage*“ SAB Modell der Ratte zeigt. Bei VEGF handelt es sich dabei um ein Protein mit komplexem Wirkungsspektrum und bekannten neuroprotektiven Eigenschaften.

In dem Vorexperiment wurde das Hirn einer definierten Ischämie durch Fadenokklusion der *A. cerebri media* ausgesetzt. Im Hauptexperiment wurde operativ eine Subarachnoidalblutung herbeigeführt, die bekanntermaßen eine verzögerte zerebrale Ischämie verursacht.

Es wurden die morphologischen Effekte untersucht, die Größe der ischämischen Läsionen wurde analysiert, die Perfusion der kleineren und größeren Gefäße mittels Angiografie bestimmt und die Expression von VEGF und CD 34 immunhistochemisch dargestellt. Das SAB Modell konnte erfolgreich zur Anwendung gebracht werden und auf die unterschiedlichen Aspekte hin analysiert werden.

Ein Teil der Tiere wurde einer SAB ausgesetzt und entweder mit VEGF Plasmid, mit einem Kontrollvektor ohne VEGF Gen oder NaCl 0,9% behandelt, während eine Kontrollgruppe nur der Operation unterzogen wurde, ohne dass Eigenblut in den Liquorraum gespritzt wurde.

Insgesamt wurden 25 (Vorexperiment) und 26 (Hauptexperiment) Gehirne analysiert. Im Vorexperiment konnte eine signifikante Reduktion des Infarktolumens der mit VEGF behandelten Tiere (43% Reduktion, $p < 0.05$) nachgewiesen werden. Im Hauptexperiment konnte in allen Tieren, bei denen eine SAB gesetzt wurde, ein signifikanter Vasospasmus induziert werden ($p < 0.02$). Im Bezug auf die Mikroperfusion konnte eine signifikant erhöhte Perfusion in den mit VEGF behandelten Tieren gezeigt werden ($p < 0.01$), jedoch ohne einen signifikanten Effekt im Bezug auf die Makroperfusion. Histologisch konnten in den Tieren, die mit VEGF behandelt wurden und einer SAB ausgesetzt wurden, sowie in den scheinoperierten Tieren, keine Infarkte nachgewiesen werden. Kleinere Infarzierungen im Sinne von Läsionen die durch Vasospasmen entstanden, konnten in der mit einem Kontrollvektor transduzierten Gruppe ($p = 0.05$) und der mit NaCl behandelten Gruppe ($p = 0.09$) nachgewiesen werden.

Zusammenfassend konnte so gezeigt werden, dass es durch die von uns gewählte Applikationsform zu einer gesteigerten Mikroperfusion, einer Hochregulation der Neoangiogenese und zu einer Reduktion der ischämischen Läsionen im Rahmen der künstlich herbeigeführten SAB kam. Diese Ergebnisse rechtfertigen weitere Untersuchungen, die um weitere Parameter ergänzt werden sollten, dabei sind insbesondere die Messung der intrazerebralen VEGF Konzentration und neurologische Beobachtungen, beispielsweise bestimmte Verhaltensänderungen, zu nennen.

III. Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1 Die Subarachnoidalblutung.....	1
1.1.1 Pathophysiologie der SAB und der verzögerten zerebralen Ischämie	1
1.1.2 Formen der SAB	2
1.1.3 Epidemiologie der SAB mit begleitender verzögerter zerebraler Ischämie	3
1.1.4 Klinik	3
1.1.5 Verlauf und Komplikationen.....	4
1.1.6 Diagnostik	5
1.1.7 Therapieoptionen und prophylaktische Maßnahmen	6
1.2 <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i> (VEGF)	9
1.2.1 Bedeutung und Funktion von VEGF	9
1.2.2 VEGF und Neuroprotektion	10
1.2.3 Gentransfer mit VEGF Plasmiden.....	11
1.3 Ziel des Experiments	11
2 Material und Methoden	14
2.1 Vermehrung des Vektorplasmids und Herstellung des Kontrollvektors	14
2.1.1 Das Vektorplasmid VEGF	14
2.1.2 Klonierung des Vektors	15
2.1.3 Herstellung des Kontrollvektors	17
2.2 Vorexperiment.....	18
2.2.1 Model der transienten fokalen Ischämie	19
2.2.2 Laserdoppler-Flowmetrie	21
2.2.3 Histologische Auswertung	21
2.2.3.1 Cresyl-Violett Färbung	21
2.2.3.2 TUNEL-Methode (<i>TdT-mediated</i> <i>dUTP-biotin nick end labeling</i>)	22
2.3 Hauptexperiment.....	23
2.3.1 SAB Modell der Ratte	24
2.3.2 Rahmenbedingungen der Tierversuche.....	26
2.3.2.1 Tierhaltung und Pflege	26
2.3.2.2 Anästhesie und Analgesie.....	27

2.3.2.3	Gentransfer	28
2.3.2.4	Tötung der Tiere und Hirnentnahme	28
2.3.3	Angiografie	28
2.3.4	Histologische Auswertung	31
2.3.4.1	Gewebefixierung	31
2.3.4.2	Herstellung der Paraffinpräparate	31
2.3.4.3	Hämatoxylin-Eosin (HE) Färbung.....	32
2.3.4.4	Immunhistochemische Färbungen	32
2.3.4.4.1	VEGF Antikörper	34
2.3.4.4.2	CD34 Antikörper	34
3	Ergebnisse	35
3.1	Vorexperiment	35
3.2	Hauptexperiment	36
3.2.1	Klinische Evaluation	36
3.2.2	Angiographische Auswertung	36
3.2.2.1	Makroperfusion	37
3.2.2.2	Mikroperfusion	38
3.2.3	Ergebnisse der morphologischen Auswertung.....	39
3.2.3.1	HE Übersichtsfärbung	39
3.2.3.2	Immunhistochemie	40
4	Diskussion	41
4.1	Das SAB Modell der Ratte	41
4.2	Angiographisch messbare Effekte	42
4.2.1	Morphologische Effekte	44
4.2.2	Anti-VEGF Antikörper	44
4.2.3	Anti CD34 Antikörper.....	45
4.2.4	Effizienz von intramuskulär applizierten VEGF-Plasmiden.....	45
5	Literaturverzeichnis	49
6	Anhang.....	55
Danksagung		55
Eidesstattliche Versicherung		56

1 Einleitung

In der vorliegenden Arbeit wurde der neuroprotektive Effekt einer Präkonditionierung mittels „*Vascular Endothelial Growth Factor*“ (VEGF) im Subarachnoidalblutungs-Modell der Ratte untersucht. VEGF wurde dabei indirekt in Form eines Plasmids mit VEGF-Gen und entsprechenden Promotoren intramuskulär appliziert.

1.1 Die Subarachnoidalblutung

1.1.1 Pathophysiologie der SAB und der verzögerten zerebralen Ischämie

Der Subarachnoidalraum (*Cavum subarachnoidale*) umgibt Gehirn und Rückenmark als ein mit Hirnwasser (*Liquor cerebrospinalis*) gefülltes Polster, in dem die empfindlichen Strukturen des ZNS regelrecht schwimmen und so vor Erschütterung geschützt sind. Hier verlaufen außerdem zahlreiche hirnversorgende Gefäße.

Kommt es zu einer Ruptur eines dieser Gefäße (meist sind die Arterien betroffen), z.B. durch Platzen einer Gefäßaussackung (Aneurysma) oder durch extreme Scherkräfte im Zuge eines Schädelhirntraumas, so spricht man von einer Subarachnoidalblutung (SAB). Eine solche SAB kann so zu akuten neurologischen Defiziten, ähnlich einem embolischen Schlaganfall führen. Schwerste Kopfschmerzen und Nackensteifigkeit sind klassische Symptome in der akuten Phase.

Nach dem initialen Blutungsereignis kann es im weiteren Verlauf zu typischen Komplikationen kommen. Neben der Ausbildung einer Liquorabflussstörung im Sinne eines *Hydrozephalus* ist hier insbesondere die verzögerte zerebrale Ischämie, u.a. bedingt durch den zerebralen Vasospasmus, entscheidend für das Überleben und das neurologische *Outcome* des Patienten.

Innerhalb von vier bis vierzehn Tagen nach dem Initialereignis ist mit dem Auftreten einer verzögerten zerebralen Ischämie zu rechnen. Die Ursachen sind dabei bislang eher unzureichend geklärt. Diskutiert wird neben der Freisetzung

von vasokonstriktorisch wirksamen Substanzen (Endotheline, Prostaglandine) [1] aus zerfallenden Erythrozyten und der Blockade von vasodilatatorischen Substanzen (Substanz P) [2] vor allem die Wirkung des freien Hämoglobins. Es vermag das für den Gefäßtonus entscheidende NO zu binden (*NO-Scavenging*) [3] und fördert so die Entstehung von Vasospasmen. Eine lokale Komplementaktivierung (Komponente des unspezifischen Immunsystems) als Reaktion auf die Hämolyse der Erythrozyten im Subarachnoidalraum spricht außerdem für eine entzündliche Komponente [4]. Als weitere Faktoren werden Störungen der Mikrozirkulation und die kortikale Streudepolarisierung diskutiert [5].

Durch die Vasospasmen kann die zerebrale Perfusion und somit die Sauerstoffversorgung des Gehirns beeinträchtigt werden. Neben passageren Vigilanzschwankungen (Schwankung von Wachheit und Bewusstsein) und neurologischen Defiziten kann es auch zu einer Ischämie mit Untergang neuronaler Zellen kommen.

1.1.2 Formen der SAB

Am häufigsten ist die traumatische SAB, z.B. im Zuge eines Schädelhirntraumas [6]. Demgegenüber stehen die spontanen Subarachnoidalblutungen. Hierbei ist die Blutung am häufigsten (>80% der Fälle) durch die Ruptur eines Aneurysmas der hirnversorgenden Arterien an der Schädelbasis (*Circulus arteriosus Willisii*) bedingt [7]. An verschiedenen Prädilektionsstellen kommt es aufgrund der speziellen Strömungs- und Druckverhältnisse zunächst zur Ausbildung von Aneurysmen. Begünstigend wirken hier neben einer genetischen Disposition [8] verschiedene Faktoren, wie z.B. eine arterielle Hypertonie [9-11], eine allgemeine Neigung zur Atherosklerose, Nikotinabusus [12], Alkoholkonsum [9], Schwangerschaft, oder Östrogenmangel [13].

Bestimmte genetische Systemerkrankungen können ebenfalls prädisponierend wirken. Als Beispiel kann das Marfan-Syndrom genannt werden [14], bei dem eine angeborene Bindegewebsschwäche verantwortlich für die Veränderungen

an den Hirngefäßen ist. Weitere seltenere Ursachen für die Entstehung eines Aneurysmas sind Infektionen (sog. mykotisches Aneurysma) und traumatische Ereignisse.

Seltenere Ursachen für eine SAB können eine Gefäßmissbildung der hirnversorgenden Gefäße (z.B. eine sogenannte arteriovenöse Malformation) [15], Vaskulitiden [16], zerebrale arterielle Dissektionen (Einrisse der Wand der Gefäße) [17] und Blutungen aus hirneigenen Tumoren [18] sein.

1.1.3 Epidemiologie der SAB mit begleitender verzögerter zerebraler Ischämie

Die SAB gehört wie oben beschrieben zu den Apoplexien (Formenkreis der Schlaganfälle). Die aktuelle Inzidenz in Deutschland liegt bei ungefähr 10 Personen pro 100.000 Einwohner und Jahr, was etwa 10.000 Neuerkrankungen pro Jahr entspricht [19]. Die höchste Inzidenz findet sich mit Raten zwischen 20 bis 30% in Japan und Finnland [19]. Die SAB kann in jedem Lebensalter auftreten, am häufigsten jedoch finden sich Ereignisse um das 50. Lebensjahr, wobei Frauen generell etwas häufiger betroffen sind [19]. Die SAB besitzt eine hohe Letalität, so dass 40% der Patienten innerhalb der ersten 30 Tage versterben [20]. Bei Rezidivblutungen liegt sie mit 50-70% noch höher [21]. 25-30% der Überlebenden haben persistierende schwere Defizite [20].

In 30-70% der Fälle kommt es nach einer SAB trotz Anwendung etablierter, prophylaktischer Maßnahmen zum Auftreten einer verzögerten zerebralen Ischämie, die bei über 25% der Patienten zu einem Schlaganfall oder zum Tod des Patienten führt. Der Vasospasmus der hirnversorgenden Gefäße hat unter allen auftretenden Komplikationen nach SAB die höchste Morbiditäts- und Mortalitätsrate [22, 23].

1.1.4 Klinik

Die Klinik wird bei der spontanen SAB v.a. durch den in 95% der Fälle plötzlich einsetzenden „Vernichtungskopfschmerz“ bestimmt. Diesem gehen bei 30-50% der Patienten leichtere Kopfschmerzen („*sentinel headache*“) als

Frühwarnsymptom etwa 6 bis 20 Tage vor der eigentlichen Blutung voraus [24, 25].

Der Kopfschmerz bei akuter SAB besitzt meist eine dem Patienten bis dahin noch unbekanntes Intensität und wird je nach Lokalisation und Umfang der Blutung in unterschiedlichem Ausmaß von weiteren Symptomen wie Übelkeit, Erbrechen, Meningismus (Zeichen einer Hirnhautreizung), Fotophobie und fokale neurologischen Defiziten begleitet. Auch die Vigilanz kann bis hin zu einem komatösen Zustand des Patienten abnehmen.

1.1.5 Verlauf und Komplikationen

Der Verlauf der SAB ist individuell sehr unterschiedlich und wird v.a. von der Menge des in den Subarachnoidalraum oder das Hirnparenchym ausgetretenen Blutes und der Lokalisation des Aneurysmas bestimmt. Weitere wichtige Prognoseparameter sind das Alter des Patienten und die Bewusstseinslage bei Einlieferung in das Krankenhaus, welche klinisch über den sogenannten GCS (*Glasgow Coma Scale*) evaluiert wird [26].

Die Gesamtmortalität der SAB wird in der Literatur mit Werten zwischen 32% und 67% beschrieben [20]. Dabei ist anzumerken, dass etwa 10% der Patienten bereits vor Erreichen des Krankenhauses versterben und etwa weitere 25% die ersten 24 Stunden nicht überleben [20]. Weiter kommt es bei etwa 25-30% der Patienten zu permanenten Defiziten, so dass nur ungefähr ein Drittel der Patienten mit gutem Resultat überlebt [20].

Als größte Komplikation im weiteren Verlauf gilt neben der Rezidivblutung das Auftreten einer verzögerten zerebralen Ischämie. Diese beginnt zwischen dem 3. und 5. Tag nach der Blutung und erreicht ihre maximale Ausprägung zwischen dem 5. bis 14. Tag post SAB, dabei halten die Vasospasmen etwa 2 bis 4 Wochen an [22, 27].

Weitere Komplikationen im Verlauf sind intrazerebrale oder subdurale Hämatome [28], der akute und der chronische Verschlusshydrozephalus [29], Elektrolytstörungen, dabei v.a. die Hyponatriämie (Natriumverlust, in diesem

Fall durch gestörte hormonelle Regulation durch die zentralen Steuerorgane im ZNS) [29], sowie Krampfanfälle [29] und Arrhythmien [30].

1.1.6 Diagnostik

Als bildgebende Diagnostik stehen dem Untersucher verschiedene Möglichkeiten zur Verfügung. Als Goldstandard hat sich dabei die native kraniale Computertomographie (cCT) etabliert [19], hierfür gibt es verschieden Gründe. So bietet die cCT nicht nur eine hohe Sensitivität (95%) [31], sofern sie innerhalb der ersten 24 Stunden durchgeführt wird, sondern erlaubt darüber hinaus eine Aussage über Ventrikelweite, bestehende Infarkte und die Blutverteilung.

Basierend auf der cCT Aufnahme kann man die Subarachnoidalblutung anhand des Blutverteilungsmusters nach Fisher klassifizieren [32]. Dabei bezeichnet Grad 1 keinen morphologischen Nachweis von Blut in den Liquorräumen, während die Grade 2-4 zunehmende Blutansammlungen v.a. in den basalen Cisternen bis hin zum Ventrikeleinbruch beschreiben. Je höher der Fisher Grad einer Blutung, desto wahrscheinlicher ist das Auftreten von Vasospasmen bzw. das Auftreten einer verzögerten zerebralen Ischämie.

Bei negativem cCT Befund, aber weiterhin bestehendem klinischen Verdacht auf eine SAB wird die Indikation zur Lumbalpunktion (Gewinnung von Liquor über eine Kanüle, die im Bereich der Lendenwirbelsäule in den Subarachnoidalraum eingeführt wird) gestellt. Hierbei kann die Anwesenheit von Blut, bzw. dessen Abbauprodukten im Liquor nachgewiesen werden. Die Lumbalpunktion ist hierbei nicht ganz unproblematisch, zum einen weil es wegen einer durch die Punktion verursachten Blutung zu einer Verfälschung des Befundes kommen kann (daher Zentrifugation), zum anderen weil eine Punktion selbst zu neurologischen Problemen führen kann [33].

Ist das sensitive Fenster der cCT Diagnostik von etwa 48 Stunden verstrichen kann die Magnetresonanztomographie (MRT) zum Einsatz kommen, welche

wiederum erst nach 2-3 Tagen eine ausreichende Sensitivität durch Nachweis von Blutabbauprodukten (Hämosiderin) bietet [34, 35].

Ist der Nachweis einer SAB erfolgt, sollte nach Möglichkeit eine konventionelle Angiographie (Gefäßdarstellung durch ein über einen Katheter endovaskulär injiziertes Kontrastmittel) erfolgen [36]. Der Katheter wird dabei über eine Punktion der *Arteria femoralis* in der Leiste eingebracht und über die *Aorta* und die Halsschlagader bis zu den hirnersorgenden Gefäßen vorgeschoben. Die Darstellung der Gefäße erfolgt dann mittels digitaler Subtraktionsangiographie (DSA). Hierbei werden kontrastgebende Strukturen wie z.B. die knöchernen Strukturen ausgeblendet, so dass die Gefäße besser zur Darstellung kommen. Auf diese Weise kann die Lage des Aneurysmas, wenn vorhanden, genau bestimmt werden. Zusätzlich kann die Konfiguration mithilfe einer 3D Rekonstruktion genau erfasst werden und als Planungsgrundlage für das weitere therapeutische Vorgehen dienen.

Im Verlauf einer stattgehabten SAB ist v.a. das regelmäßige *Screening* der Hirngefäße auf das Auftreten von Vasospasmen von klinischer Bedeutung. Hier ist die transkraniale Dopplersonographie ein etabliertes Verfahren [37]. Dabei wird der Blutfluss in den großen hirnersorgenden Arterien bestimmt, wobei eine erhöhte Blutflussgeschwindigkeit auf ein verengtes Gefäß, wie es im Rahmen eines Vasospasmus auftritt, hinweist. Verifiziert werden kann dies in der Perfusionmessung mittels Perfusions-CT (pCT) oder Perfusionmessung in der MRT. Regionale Minderperfusionen sind hierbei als Hinweis für eine verzögerte zerebrale Ischämie in dem entsprechenden Areal zu sehen. Beweisend für Vasospasmen ist neben der Klinik die DSA mit Nachweis von enggestellten Gefäßen.

1.1.7 Therapieoptionen und prophylaktische Maßnahmen

Die SAB ist ein Notfall und sollte deshalb stets in entsprechenden Zentren, die über die notwendigen diagnostischen Instrumente und über die operative sowie interventionelle Kompetenz zur Versorgung der Aneurysmen verfügen [37], versorgt werden.

Die größte akute Bedrohung für den Patienten besteht neben der Entstehung des *Hydrozephalus* in der Rezidivblutung, die es zu verhindern gilt [38]. Um dies zu erreichen muss das Aneurysma aus dem Blutkreislauf ausgeschaltet werden, was eine interdisziplinäre Herausforderung für Neurochirurgen und Neuroradiologen bedeutet. Dabei entscheidet v.a. die oben beschriebene neuroradiologische Darstellung des Aneurysmas (Konfiguration und Lokalisation) über den weiteren Therapieweg. Von Seiten der Neurochirurgie besteht dabei die Möglichkeit, das Aneurysma durch das sog. *Clipping*, also das Setzen von Titanclips, auszuschalten. Dazu muss das Aneurysma, v.a. der Aneurysmahals, zunächst über einen, je nach Lage des Aneurysmas, standardisierten, operativen Zugang dargestellt werden. Anschließend wird der *Clip* über den Hals des Aneurysmas gesetzt und somit das Aneurysma aus dem Blutfluss ausgeschaltet. Von Seiten der Neuroradiologie besteht die Möglichkeit, das Aneurysma endovaskulär anzugehen. Dabei wird ein Katheter mit derselben Technik, die für die Angiographie beschrieben wurde, unter Röntgenkontrolle bis zum Hals des Aneurysmas vorgeschoben. Über den korrekt positionierten Katheter kann dann eine Titanspirale (sog. *Coil*) in das Aneurysma vorgeschoben werden. Die Zwischenräume der Spirale thrombosieren nach kurzer Zeit. Somit ist auch hier das Aneurysma aus dem Blutstrom ausgeschaltet. Beide Verfahren bieten verschiedene Vor- und Nachteile, und wurden in einer großangelegten Studie einander gegenüber gestellt. In der sog. ISAT (*International Subarachnoid Aneurysm Trial*) Untersuchung wurden Morbidität und Mortalität von Patienten, die dem jeweiligen Verfahren unterzogen wurden, über den Zeitraum mehrerer Jahre miteinander verglichen. Man kam zu dem Ergebnis, dass die endovaskuläre Versorgung der operativen Versorgung überlegen sei [39]. Die Ergebnisse blieben jedoch umstritten, so dass die jeweilige Methode der Wahl eine Einzelfallentscheidung bleibt.

Im weiteren Verlauf stellt wie bereits oben erwähnt das Auftreten der verzögerten zerebralen Ischämie die größte Komplikation dar. Die etablierte, prophylaktische Standardtherapie besteht aus einer intensivmedizinischen

Überwachung der Patienten sowie der medikamentösen systemischen Verabreichung des Calciumantagonisten Nimodipin. Die intravenöse sowie die orale Applikation ist hierbei möglich [40-42]. Treten klinisch und radiologisch verifizierte Vasospasmen auf, empfiehlt sich die hypertensive Therapie. Mechanische Erweiterungen der enggestellten Gefäße durch eine segmentale transluminale Ballon-Angioplastie oder alternativ die intraarterielle Injektion der Vasodilatoren Nimodipin oder Papaverin können als weitere Therapieschritte folgen. Dennoch und trotz dieser Therapien erleiden etwa 10-20% der Patienten nach überlebter Subarachnoidalblutung durch die verzögerte zerebrale Ischämie klinisch relevante Hirninfarzierungen, welche schwere Behinderungen nach sich ziehen und bis zum Tode führen können [43]. Somit bleibt die Verbesserung der Therapie der verzögerten zerebralen Ischämie einer der Hauptherausforderungen in der Forschung auf dem Gebiet der SAB Therapie [44].

Ein anderer potentiell therapeutischer Ansatz besteht in der Präkonditionierung des Gehirns, also der Vorbereitung des Hirngewebes auf die bevorstehende Hypoxie.

Multiple Substanzen zur Verbesserung der Gehirnperfusion, neuroprotektive Substanzen, sowie Substanzen zur Unterstützung der Angiogenese wurden bei der Behandlung der Ischämie erprobt [45, 46].

Vascular endothelial growth factor (VEGF) ist hierbei ein vielversprechendes endogenes Molekül. VEGF ist an der Neoangiogenese, der Inhibition von Apoptose (programmierter Zelltod) sowie an Prozessen, die das Lernen und das Gedächtnis betreffen, beteiligt [47].

Bei der aneurysmatischen SAB und der im Verlauf entstehenden verzögerten zerebralen Ischämie ergibt sich gegenüber einer Ischämie durch ein embolisches Ereignis der Vorteil der Vorhersehbarkeit. Abhängig von der Blutungsausdehnung kann die Wahrscheinlichkeit von Vasospasmen und daraus resultierenden Ischämien abgeschätzt werden. Diese entstehen in der Regel erst ab dem 3.-5. Tag nach dem initialen Blutungsereignis [48], so dass

hier die Möglichkeit einer Präkonditionierung und somit der Vorbereitung des Gehirngewebes auf mögliche Minderversorgung gegeben ist. Da die verzögerte zerebrale Ischämie in den ersten drei Wochen nach Blutungsereignis auftreten kann, ist eine kontinuierliche Therapie sinnvoll. Eine einfache und schonende Methode zur Erhöhung der VEGF Konzentration ist die Unterstützung der endogenen Produktion durch exogen zugeführte VEGF-DNA in Form eines Plasmides [49, 50].

1.2 *Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)*

1.2.1 Bedeutung und Funktion von VEGF

VEGF ist ein wichtiges Signalmolekül mit zahlreichen unterschiedlichen Funktionen. Dabei beschreibt der Begriff VEGF weniger ein einzelnes Molekül, als vielmehr eine Familie von Proteinen mit teilweise ähnlichen, teilweise aber auch unterschiedlichen Aufgaben. Für die vorliegende Fragestellung ist VEGF-A₁₆₄ aufgrund seines Wirkspektrums im neuroprotektiven Bereich am besten geeignet und wurde somit für die Versuchsreihen ausgewählt. Der Index 164 beschreibt dabei die Zahl der im Molekül vorhandenen Aminosäuren und ist entscheidend für die Rezeptoraffinität zu den verschiedenen VEGF-Rezeptoren, die allesamt aus Tyrosinkinasen bestehen. Nach Bindung eines VEGF Moleküls kommt es durch Dimerisierung zweier Rezeptoruntereinheiten zur Signaltransduktion in das intrazelluläre Kompartiment. Zu den Funktionen der VEGF Proteine gehört neben der Vaskulogenese, also der Blutgefäßentwicklung während der Embryogenese, vor allem die Angiogenese, dass Aussprossen bereits vorhandener Gefäße [51]. Diese Wirkung wird vor allem durch die Anregung der Endothelzellproliferation erreicht, aber auch die Stimulation der Migration von Monozyten und Makrophagen spielt hier eine Rolle [52].

Außerdem wird die Produktion von Stickstoffmonoxid (NO) in der Gefäßwand gefördert, ein Molekül von entscheidender Bedeutung für den Tonus der Gefäßmuskulatur (Vasodilatation). Die Produktion von VEGF wird unter

natürlichen Bedingungen vor allem durch den Zustand der Hypoxie angeregt. Zellen, die nicht genügend Sauerstoff erhalten, produzieren die sog. HIFs (*Hypoxie Inducible Factors*), die dann zur Ausschüttung von VEGF führen.

1.2.2 VEGF und Neuroprotektion

Neben den oben beschriebenen Funktionen im Bereich der Angiogenese konnte in verschiedenen Studien gezeigt werden, dass VEGF darüber hinaus neuroprotektive Effekte besitzt. Dabei ist die Neuroprotektion zum einen indirekt über die Neubildung von Gefäßen bedingt, auf der anderen Seite existiert aber auch ein direkter, neuroprotektiver Effekt unabhängig von der Neoangiogenese [53-55].

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass es sowohl im Tiermodell als auch beim Menschen nach einer Ischämie zu einer verstärkten Expression von endogenem VEGF im Gehirn kommt [56].

Aufgrund dieser vielversprechenden Eigenschaften wurde VEGF als exogen zugeführter Wirkstoff bei zerebralen Ischämien in verschiedenen Studien untersucht [55, 57, 58], v.a. im Hinblick auf den protektiven Effekt bei ischämisch bedingtem Schlaganfall [59-61].

Wesentliche Nachteile des VEGF Proteins bestehen dabei v.a. in der kurzen Halbwertszeit, dem hohen Kostenfaktor und der geringen Stabilität *in vivo*.

Untersucht wurden deshalb verschiedene alternative Applikationsformen, wie z.B. die lokale Abgabe durch Injektion von VEGF haltigen Hydrogelen [62], die Transplantation von VEGF transduzierten neuronalen Stammzellen [63] oder die Induktion einer lokale Überexpression des VEGF Proteins durch Adenoviren [64]. Dabei wurde stets der Effekt auf eine bereits zuvor bestehende Ischämie untersucht. Eine neuroprotektive Wirkung konnte dabei in unterschiedlichem Ausmaß nachgewiesen werden.

Die neuroprotektiven Effekte unter ischämischen Bedingungen bestanden vor allem in der Inhibition des programmierten Zelltodes (Apoptose) der Neurone. Des Weiteren wirken sich die direkten vaskulären Effekte, wie die

Gefäßneubildung und die erhöhte Permeabilität der Gefäße (insbesondere für Glukose), sowie die Aktivierung von Antioxidantien positiv auf die Neurone aus. Dabei beschränken sich die protektiven Einflüsse nicht nur auf die Neurone selbst, sondern betreffen ebenso andere Zelllinien des Nervensystems, wie beispielsweise die Astrozyten (Zahlenmäßig größte Vertreter des Stützgewebes im Nervensystem, mit Bedeutung für die Homöostase und Metabolismus der Neurone), die Schwann Zellen (Stützzellen peripherer Neurone) und die Mikroglia (den Makrophagen ähnlich) [65].

Negative Effekte resultieren vor allem aus der oben beschriebenen Erhöhung der Gefäßpermeabilität, die zu der Entstehung eines postischämischen Hirnödems (Hirnschwellung) beitragen kann. Das Hirnödem kann je nach Ausmaß das *Outcome* des Patienten massiv verschlechtern und bis zum Tod des Patienten führen. Insgesamt erscheint diese Komplikation jedoch beherrschbar und die Vorteile dominieren.

1.2.3 Gentransfer mit VEGF Plasmiden

Ein großes Problem bei vorhergehenden Studien zur neuroprotektiven Wirkung von VEGF bei verschiedenen Ischämie-Modellen ist die geringe Halbwertszeit des VEGF Moleküls. Außerdem ist es, wie oben beschrieben, ein *in vivo* eher instabiles Molekül und auch der Kostenfaktor liegt extrem hoch.

Eine elegante Option zum Erreichen einer kontinuierlichen Erhöhung des VEGF Spiegels bietet der Gentransfer mit einem VEGF-Gen tragenden Plasmid. Dabei wird das Plasmid mit Hilfe einer geeigneten Kanüle intramuskulär appliziert, anschließend von Muskelzellen aufgenommen und über Promotoren schließlich exprimiert und in die Blutbahn freigesetzt. Über die Blutbahn gelangt VEGF zum Nervensystem, um hier seine Wirkung zu entfalten.

1.3 Ziel des Experiments

Die Wirksamkeit des VEGF Proteins im Bezug auf die Neuroprotektion im Rahmen einer zerebralen Ischämie konnte in verschiedenen, oben genannten

Studien, belegt werden. Dabei wurden bisher stets nur solche Effekte untersucht, die bei Applikation nach stattgefundenener Ischämie zu beobachten sind.

Im Rahmen einer SAB findet sich eine veränderte Situation, denn wie zuvor erläutert, stellt die zerebrale Ischämie eine Komplikation dar, die mit einigen Tagen Latenz auftritt. Daher bietet sich hier die Chance für die behandelnden Ärzte bereits vor dem eigentlichen Auftreten der verzögerten zerebralen Ischämie eine Therapie einzuleiten und die neuroprotektiven Effekte des VEGF Proteins zu nutzen. Hierdurch können potentielle Komplikationen der zu erwartenden Ischämie möglicherweise bereits vor Ihrer Entstehung kompensiert bzw. im weiteren Verlauf reduziert werden. Des Weiteren ist vorstellbar, dass durch die Applikation vor Eintreten der Ischämie weitere Mechanismen in Gang gesetzt werden, die bei einer nachträglichen Verabreichung gar nicht erst zum Tragen kommen, so dass die neuronalen Strukturen auf die bevorstehende Ischämie „vorbereitet“ werden können (Präkonditionierung).

Ein großes Hindernis in der VEGF Therapie eine konstant effektive Konzentration des Proteins vor Ort zu erreichen. Eine wiederholte Injektion des Moleküls führt dabei zu stark schwankenden Konzentrationen.

Die Stimulation der Produktion in der Muskelzelle durch Applikation von VEGF-DNA-tragenden Plasmiden stellt eine völlig veränderte Darreichungsform dar, die über einen anderen Konzentrationsverlauf möglicherweise eine effektivere Wirkung entfalten kann.

Wie zuvor ist die durch eine SAB bedingte verzögerte zerebrale Ischämie das Ergebnis eines komplexen Zusammenspiels verschiedener Prozesse. Die Komplexität macht es schwer, das genaue Ausmaß der Ischämie vorherzusehen, v.a. aber wird eine Standardisierung des Ischämiegrades experimentell schwer zu verwirklichen. Aus diesem Grund wurde eine erste Versuchsreihe gestartet, bei dem die Ischämie nicht durch eine SAB, sondern durch eine gezielte Fadenokklusion der *A. cerebri media* herbeigeführt wurde.

Hierdurch wurde in jedem Gehirn dasselbe Areal in demselben Ausmaß einer Ischämie über einen fest definierten Zeitraum ausgesetzt.

Die Hauptversuchsreihe konzentrierte sich dann wieder auf die SAB als Auslöser der Ischämie, da sich das Tierversuchsmodell möglichst nah an den pathophysiologischen Vorgängen beim Menschen orientieren sollte, und die Fadenokklusion an sich derart komplexe Vorgänge nicht hinreichend getreu zu simulieren vermag.

2 Material und Methoden

Die Untersuchungen zu den neuroprotektiven Effekten durch den Gentransfer von VEGF Plasmiden wurden in zwei verschiedenen Experimenten durchgeführt. Das Vorexperiment diente dabei vor allem der Orientierung und der Etablierung des Gentransfers bei standardisierten Ischämieverhältnissen, hierbei wurde die Ischämie durch eine Fadenokklusion der *A. cerebri media* herbeigeführt (siehe unten). Im Hauptexperiment wurde der Effekt der VEGF Plasmiden im SAB Modell der Ratte untersucht.

Die Herstellung der Plasmide bzw. Kontrollvektoren lief in beiden Experimenten identisch ab, und auch die Rahmenbedingungen der Tierversuche (Pflege, Futter, etc.) waren in beiden Versuchsreihen identisch.

2.1 Vermehrung des Vektorplasmids und Herstellung des Kontrollvektors

2.1.1 Das Vektorplasmid VEGF

Bei Plasmiden handelt es sich um ringförmige, extrachromosomale bakterielle DNA-Moleküle, die unabhängig von der chromosomalen DNA des Bakteriums repliziert werden können, und sich somit je nach Plasmidtyp (*high-copy* bzw. *low-copy*) in unterschiedlicher Anzahl im Bakterium finden. Plasmide sind beliebte Genträger (Vektoren) in der Molekularbiologie und verfügen neben verschiedenen spezifischen Antibiotikaresistenzen, die wichtig für die Selektion plasmidtragender Bakterien sind, über unterschiedliche Promotoren, die die Genexpression in der Zelle ermöglichen.

Da wir in unserem Fall die Expression in einer eukaryotischen Säugetierzelle realisieren wollten, verfügt das Plasmid über entsprechende Promotoren (Initiatoren der Genexpression und Andockstelle für die Transkriptionsenzyme). Abbildung 1 beschreibt den verwendeten Vektor, der uns für unser Projekt freundlicherweise vom Max Planck Institut in Martinsried zur Verfügung gestellt wurde.

Vektor Karte:

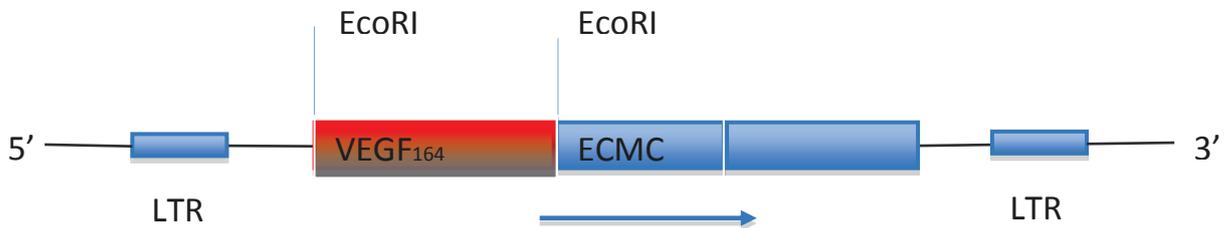


Abb.1: Vektorkarte mit VEGF Gen, das von den zwei Schnittstellen EcoRI flankiert wird. LTR bezeichnet die *Long Terminal Repeats*. In der mit ECMC bezeichneten Region befinden sich die unten beschriebenen Resistenzgene.

Der Ausgangsvektor trug den Namen VEGF #503. Auf diesem Ausgangsvektor befindet sich eine Schnittstelle für die Nuklease EcoRI, in die nach entsprechendem Schnitt das VEGF₁₆₄ Gen eingefügt wurde, so dass nun zwei neue Schnittstellen entstanden. Flankiert wird das eigentliche Gen durch die sog. LTR-Bereiche. LTR bezeichnet dabei die Regionen der *Long Terminal Repeats*, die aus repetitiven Basensequenzen bestehen. So enthalten sie neben dem Promotorelement z.B. die sog. *Enhancer* (Elemente, die die Genexpression verstärken) und Polyadenylierungssignale, die über die Synthese des sog. Poly-A-Schwanzes zur Stabilisierung der mRNA beitragen.

Das Plasmid trägt Resistenzgene für Ampicillin und G418, (Aminoglykosidantibiotikum).

2.1.2 Klonierung des Vektors

Zur Vervielfältigung der Vektoren wurden kompetente E.coli mit diesem transformiert. Eine geringe Menge an DNA (wenige pg) wurde auf 100µl kompetente E.coli (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Herrn Verian Bader, Laboratorien der Neuropathologie an der Uniklinik Düsseldorf) gegeben, anschließend erfolgte die Zugabe von 2µl 0,5M β-Mercaptoethanol (β-Mercaptoethanol, Sigma-Aldrich Biochemie GmbH, Hamburg, Deutschland).

Der Ansatz wurde dann für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Daraufhin wurde ein Hitze-Schock für 30 Sekunden im Wasserbad bei 42°C durchgeführt und eine erneute Inkubation auf Eis für zwei Minuten angeschlossen. 800µl Circle growth Medium (SOC-Medium, Sigma-Aldrich Biochemie GmbH) wurden nun hinzugefügt und die Bakterien für eine Stunde bei 37°C im Schüttelinkubator (Innova® 42, New Brunswick Scientific, Nürtingen, Deutschland) inkubiert. Die Suspension wurde auf ampicillinhaltige Agar-Platten (LB-Agar Ampicillin 100, Sigma-Aldrich Biochemie GmbH) übertragen und mit einem Glasstab eingerieben. Eine 24-stündige Inkubation bei 37°C schloss sich an. Isoliert gewachsene Kolonien wurden von der Agar-Platte in flüssiges LB-Medium (LB-Medium (Lennox), Carl Roth GmbH+Co. KG) mit Ampicillin (0,1µg/ml) überführt. Bei dem sog. LB-Medium (engl. *lysogenic broth*) handelt es sich um eine etablierte Lösung zur Anzucht von Bakterienkulturen in Flüssigmedien, bestehend aus Hefeextrakt, Trypton und Natriumchlorid. Die Kulturansätze wurden über Nacht im Schüttel-Inkubator bei 37°C vermehrt. Bei ausreichender Kulturdichte, die mit Hilfe von Absorptionsspektrometrie (Spektrophotometer: Nano-Drop® ND-1000, Peqlab, Erlangen, Deutschland) bestimmt wurde, erfolgte am Tag darauf die Plasmid-Präparation unter Verwendung eines Kits (QIAGEN Plasmid Giga Kit; Pasmid Mega Kit; Plasmid Maxi Kit; Plasmid Mini Kit, QIAGEN, Hilden, Deutschland). Nach jedem Produktionslauf wurden die Konzentrationen der Plasmide mittels Absorptionsspektrometrie (Spektrophotometer: Nano-Drop® ND-1000) bestimmt und die Plasmide mit Hilfe der Gelelektrophorese überprüft. Der Gellauf in 1%igem Agarosegel (Herstellung nach Standardverfahren: Agarose NEEO, Ultra-Qualität, Carl Roth GmbH+Co. KG, Karlsruhe, Deutschland und TAE-Puffer, Rotiphorese, Carl Roth GmbH+ Co. KG) erfolgte hier, wie auch bei allen anderen Kontrollen bei 133V für 45min in 1x TAE Puffer. Das Gel enthielt 0.5 mg/l Ethidiumbromid (Ethidiumbromidlösung 0,025 %, Carl Roth GmbH+Co. KG) zur DNA Markierung. So konnten die Banden im Anschluss unter UV-Licht mittels einer speziellen Kamera (LAS-3000 mini, FujiFilm Imaging GmbH und Co. KG, Willich, Deutschland) sichtbar gemacht werden. Die Plasmid-DNA wurde in

Tris-EDTA (pH 8,0) (TRIS-EDTA Buffer Solution 8.0, Sigma-Aldrich Biochemie GmbH) aufgenommen und bei -80°C gelagert.

2.1.3 Herstellung des Kontrollvektors

Die Herstellung des Kontrollvektors ohne das VEGF-Gen erfolgte in mehreren Schritten.

Zunächst wurde das Plasmid mit der Nuklease EcoRI (Eco R1, *high concentrated*, 50.000 U (40 U/μl), Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland) bei 37°C über zwei Stunden verdaut. Wie die Vektorkarte zeigt, wird das VEGF-Gen auf dem Plasmid genau von zwei EcoRI Schnittstellen flankiert, somit wurde das VEGF-Gen im ersten Schritt bereits ausgeschnitten.

Im nächsten Schritt wurde die verdaut DNA bei 133V für 45 min. in einem Elektrophorese Gel laufen gelassen. Die Kammern wurden dabei extra für große Volumina präpariert. Nach Identifikation der VEGF defizienten Bande über die Anzahl der Basenpaare im Elektrophoresegel wurde diese mit einem Präparationsmesser ausgeschnitten.

Dann wurde das ausgeschnittene Gelstück mithilfe des Qiaquick Purification Kits (QIAGEN) streng nach Protokoll des Herstellers aufbereitet. Ein kleiner Teil der so gewonnenen DNA wurde erneut einer Gelelektrophorese für Kontrollzwecke unterzogen.

Anschließend folgte die Dephosphorylierung der 5'-Enden durch Inkubation mit alkalischer Shrimp Phosphatase (rAPid Alkalische Phosphatase, 1000 U, Roche Diagnostics GmbH) bei 37°C für eine Stunde. Daraufhin wurde die alkalische Shrimp Phosphatase durch Inkubation bei 65°C für 15 min. inaktiviert. Die dephosphorylierte DNA wurde erneut mithilfe des Qiaquick Purification Kits aufgereinigt.

Es folgte die Religation der freiliegenden „*sticky-ends*“ des Plasmids. Hierzu wurde die dephosphorylierte, aufgereinigte DNA mit T4 DNA Ligase (T4 DNA Ligase, 100 U (1 U/μl), Roche Diagnostics GmbH) bei 4°C über Nacht inkubiert.

Die durch die Religation nun wieder zirkulären DNA Plasmide wurden erneut durch eine Gelelektrophorese nachgewiesen und selektiert.

2.2 Vorexperiment

Die zentrale Fragestellung der vorliegenden Arbeit dreht sich um das Krankheitsbild der SAB, allerdings weist das SAB Modell der Ratte einige Schwachstellen auf, die ein orientierendes Vorexperiment notwendig machten. Die Ischämiezeit und das Ausmaß der betroffenen Areale sind im SAB Modell recht schwierig zu analysieren und interindividuell sehr verschieden. Hauptproblem ist hierbei der morphologische Nachweis der Ischämien, da es sich häufig nicht um große territoriale Infarkte, sondern um kleine lokale Infarzierungen, welche histologisch schwerer nachzuweisen sind, handelt. Vor einer größeren Versuchsreihe sollte deshalb geklärt werden, ob die von uns gewählte Applikationsform des VEGF Plasmids im Rahmen einer territorialen Ischämie einen Einfluss hat.

Eine Möglichkeit, eine gesicherte Ischämie über einen definierten Zeitraum zu erzeugen, bietet das Tiermodell der transienten fokalen Ischämie nach Koizumi et. al. [66]. Dies ist in diesem Zusammenhang das am häufigsten verwendete Modell und beruht auf einer vorübergehenden Okklusion der *A. cerebri media* mit nachfolgender Reperfusion. Abbildung 2 zeigt die Platzierung des Okklusionsfadens in den Hirngefäßen der Ratte.

Im vorliegenden Experiment erhielten drei Gruppen männlicher Wistar Ratten (n=32) dreimal eine intramuskuläre Injektion in einem Intervall von jeweils sieben Tagen. Die erste Gruppe wurde mit dem VEGF Plasmid behandelt, die zweite mit dem Kontrollvektor und die dritte mit 0,9% Kochsalzlösung (NaCl 0,9 %, Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland).

Sieben Tage nach dem letzten Gentransfer wurden alle Tiere nach dem Modell der „*transient middle cerebral artery occlusion*“ (tMCAO) einer Operation mit Okklusion der *A. cerebri media* für jeweils 90 Minuten unterzogen, dabei

erfolgte ein ständiges *Monitoring* der Hirnperfusion mithilfe des Laserdoppler-Flowmetrie Gerätes (MoorVMS-LDF®, Moor Instruments, Devon, UK). Die Körpertemperatur wurde rektal gemessen und konstant bei $37.0 \pm 0.5^\circ\text{C}$ gehalten. Nach 24 Stunden wurden die Tiere dann fachgerecht getötet und ihre Gehirne zur weiteren Analyse fixiert. Um die Größe des Infarktareals genau zu bestimmen wurde eine Cresyl-Violett Färbung durchgeführt. Der neuronale Schaden wurde mittels TUNEL Färbung analysiert (siehe unten).

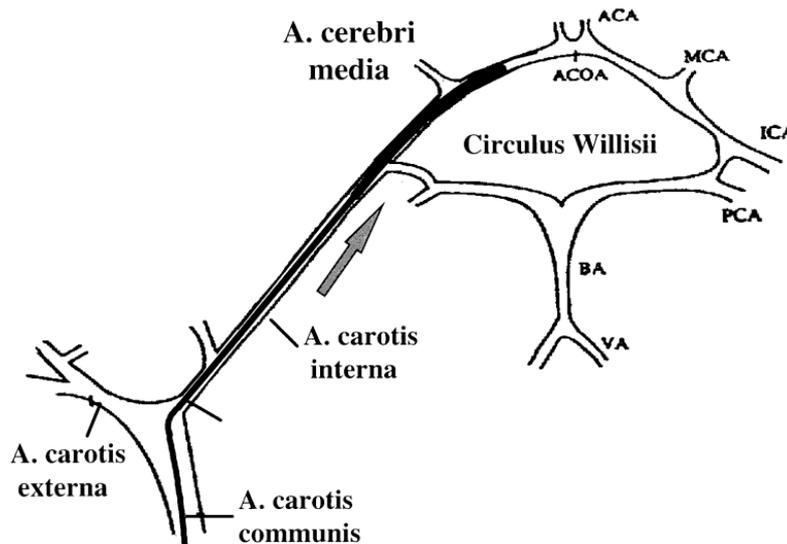


Abb. 2: Schematische Darstellung des Okklusionsfadens im Gefäßsystem des ZNS. Die *A. cerebri media* ist auf einer Seite komplett verschlossen. Modifiziert nach Koizumi et.al. [66].

2.2.1 Model der transienten fokalen Ischämie

Um eine vorübergehende Ischämie zu erreichen, wurde im vorliegenden Experiment der temporäre Verschluss der *A. cerebri media* durch das Verschieben eines Nylonfadens (4/0, 1,5 metric, monofilament; Ethilon®, Ethicon GmbH & Co. KG, Deutschland) über die *A. carotis communis* herbeigeführt (siehe Abb.2). Die Spitze des Fadens wurde zuvor silikonisiert (Provil®, Bayer AG, Leverkusen, Deutschland) um eine Perforation des Gefäßes zu verhindern und eine absolute Abdichtung des Gefäßlumens zu erreichen.

Um den Faden in das Gefäß einzuführen, musste dieses zunächst präpariert werden. Dazu wurde das auf dem Rücken liegende Tier unter Narkose im rasierten Operationsgebiet von *submandibulär* bis zum *Jugulum* in der Halsmitte längs inzidiert. Nach stumpfer Präparation in die Tiefe erfolgte die Darstellung und gleichzeitige Separation des *M. sternokleidomastoideus* und der *prätrachealen* Muskulatur. Unter dem Mikroskop konnte die Gefäß-Nerven-Scheide zwischen den separierten Muskeln dargestellt werden. Vorsichtig wurde dann unter Schonung des *N. vagus* die *A. carotis communis* freigelegt und über ihre *Bifurkation* hinaus nach *kranial* präpariert. Im Anschluss wurden die Aufzweigungen der *A. carotis communis* präpariert mit Darstellung der *A. carotis externa* und ihres Astes, der *A. occipitalis*, sowie der Freilegung der *A. carotis interna*. Im weiteren Verlauf wurde die *A. carotis communis* unterfahren und mit einer Vinylschlinge angeschlungen. Anschließend wurde die *A. carotis externa* distal des Abgangs der *A. occipitalis* ligiert (durch einen außen anliegenden Faden abgebunden). Außerdem wurde die *A. carotis communis* thoraxnah ligiert, um einen retrograden Blutfluss zu unterbinden. Eine weitere Ligatur wurde direkt proximal der *Carotisbifurkation* gesetzt. Nun konnte die *A. carotis communis* ohne störenden Blutfluss zwischen den beiden Ligaturen eröffnet werden, und der präparierte Faden über das Gefäß eingebracht werden. Zeigte sich die Fadenspitze distal der bifurkationsnahen Ligatur, konnte dies geöffnet werden und der Faden ohne Blutverlust bis in die *A. cerebri media* vorgeschoben werden, die korrekte Position des Fadens wurde dem Untersucher dabei durch einen leichten Widerstand angezeigt. Zudem diente eine Markierung (16mm von der Fadenspitze) als Orientierungshilfe.

Die so erreichte Okklusion wurde außerdem durch eine Perfusionsmessung (Messung der Durchblutung im Hirngewebe) mittels Laserdopplerflowmetrie verifiziert. Die so erzeugte Ischämie wurde für 90 min. beibehalten. Anschließend wurde der Faden wieder vorsichtig entfernt, das Gefäß verschlossen und die Wunde mit Einzelknopfnähten verschlossen.

24 Stunden nach der operativ gesetzten Ischämie wurden die Tiere fachgerecht getötet. Die Gehirne wurden entnommen und zur weiteren Analyse wie im Hauptexperiment (siehe unten) beschrieben fixiert.

2.2.2 Laserdoppler-Flowmetrie

Die Laserdoppler-Flowmetrie ermöglicht eine Beurteilung der zerebralen Perfusion. Zunächst wurde das Bohrloch zur Implantation der Sonde des Laserdopplerflowmetriegerätes präpariert. Dafür wurde das Fell und die Kopfschwarte über dem *Bregma* (Zusammentreffen der Kranznaht und Pfeilnaht des Schädels) in einem Radius von ca. 1 cm kreisrund abgesetzt. Auf der *Kalotte* wurden insgesamt zwei Markierungen 1 mm vor dem *Bregma*, jeweils 5 mm lateral der Medianlinie angebracht. Im Bereich dieser Markierungen entfernten wir *Tabula externa* und *Spongiosa* mittels Fräse (Dremel 4000, Dremel, Wien, Österreich). Auf den so ausgedünnten Schädelknochen konnten dann die Glasfasersonden mittels Halterungsschrauben (Moor Instruments) aufgebracht werden. Mittels des Prinzips der Laserdopplerflowmetrie konnte dann die Erythrozytenkonzentration und deren Flussgeschwindigkeit im Messbereich der Sonden registriert werden. Daraus konnten dann die so genannten Perfusionseinheiten (PU=Perfusion Units) als Maß für den kapillaren Blutfluss errechnet werden. Vor, während und nach Setzen der Ischämie konnte der Blutfluss mit der Doppler-Flowmetrie bei den in Bauchlage befindlichen Tieren auf diese Weise permanent gemessen und aufgezeichnet werden.

2.2.3 Histologische Auswertung

2.2.3.1 Cresyl-Violett Färbung

Die Cresyl-Violett Färbung ist eine histologisches Standardfärbemethode nach festem Protokoll und besonders geeignet für das Anfärben von Neuronen. Es wird dabei vor allem die sogenannte Nissl-Substanz (vergleichbar mit dem rauhen endoplasmatischen Retikulum nicht neuronaler Zellen) angefärbt. Diese

Färbemethode bietet eine gute Übersicht und ermöglicht die Bestimmung der Infarktgröße in dem jeweiligen histologischen Schnitt.

2.2.3.2 TUNEL-Methode (*TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling*)

Die TUNEL Methode ist eine Färbetechnik der Fluoreszenzmikroskopie, die Kerne apoptotischer Zellen (Apoptose=programmierter Zelltod) detektiert. Wird eine Zelle apoptotisch, so kommt es durch die Aktivität von zelleigenen Endonukleasen (DNA spaltende Enzyme) zu einer Fragmentierung der DNA. Durch diese hochmolekularen Einzelstrangbrüche („nicks“) entstehen freie 3´-OH Gruppen. An diese freien Enden kann das Enzym TdT (*Terminal Deoxynucleotidyl Transferase*) binden und die Bildung eines Polydeoxynucleotid Polymers katalysieren. Auf diese Weise werden die „nicks“ durch TdT mit biotinyliertem Deoxyuridin (dUTP) versehen, welches im nächsten Schritt durch mit Fluoreszin markierten Antikörpern detektiert werden kann, und so in der Fluoreszenzmikroskopie sichtbar wird. Sämtliche Reagenzien dieser komplexen Färbemethode bis auf den unten erwähnten PBS Puffer wurden im kompletten Kit bezogen (In Situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein, Roche Diagnostics Deutschland GmbH). Das Protokoll des Herstellers wurde strikt befolgt.

Zunächst wurden die Proben bei Raumtemperatur mit Blocklösung (0.3% H₂O₂ in Methanol) für 30 min. inkubiert um endogene Peroxidasen zu inaktivieren. Danach wurden die Proben für 5 min. mit PBS Puffer (Roche Diagnostics GmbH) gewaschen und anschließend für 10 min. mit Permeabilisationslösung (0.1% Natrium-Citrat) inkubiert.

Es folgte das erneute Waschen mit PBS Puffer und das vorsichtige Trocknen der Schnitte, bevor jeweils 25 µl des TUNEL-Reaktionsgemisches (Enzym- und Färbelösung) aufgebracht wurden. Die benetzten Schnitte wurden für 60 min. bei 37°C in einer feuchten Kammer inkubiert. Anschließend folgten 3 Waschgänge mit PBS Puffer für jeweils 5 min. und das Abdecken mit einem Deckglas.

Aufgrund der hohen Empfindlichkeit dieser Färbemethode waren Negativkontrollen und mehrmalige Bestimmungen notwendig. Eine Positivkontrolle wurde durch Vorinkubation mit DNase und dadurch bedingter Induktion von detektierbaren Einzelstrangbrüchen erreicht.

2.3 Hauptexperiment

Im Hauptexperiment wurden die Versuchstiere (n=80) randomisiert in vier Gruppen eingeteilt. Jedes Tier eines Käfigs wurde derselben Gruppe zugeordnet (Block-Randomisierung) und jeder Käfig wurde alternierend einer der vier Gruppen zugeordnet (Quasi-Randomisierung): Einer mit VEGF transduzierte Gruppe, einer mit dem Kontrollvektor transduzierte Gruppe und einer mit 0,9% Kochsalzlösung behandelte Gruppe, die jeweils dreimal im Intervall von sieben Tagen die Injektion erhielten. Eine Woche nach dem letzten Gen Transfer wurde an zwei aufeinanderfolgenden Tagen dann operativ eine SAB gesetzt. Die vierte Gruppe wurde im Vorfeld im selben Intervall mit 0,9% Kochsalzlösung behandelt und anschließend ohne das Setzen einer SAB derselben Operation unterzogen (scheinoperiert). Einen Überblick über die zeitlichen Abläufe gibt Abbildung 3.

Fünf Tage nach Setzen der letzten SAB wurden eine bildgebende Diagnostik mittels DSA durchgeführt. Die Tiere wurden anschließend fachgerecht getötet, die Hirne zur histologischen Aufarbeitung entnommen und in Formaldehyd 35% fixiert (Paraformaldehyd, Carl Roth GmbH+ Co. KG).

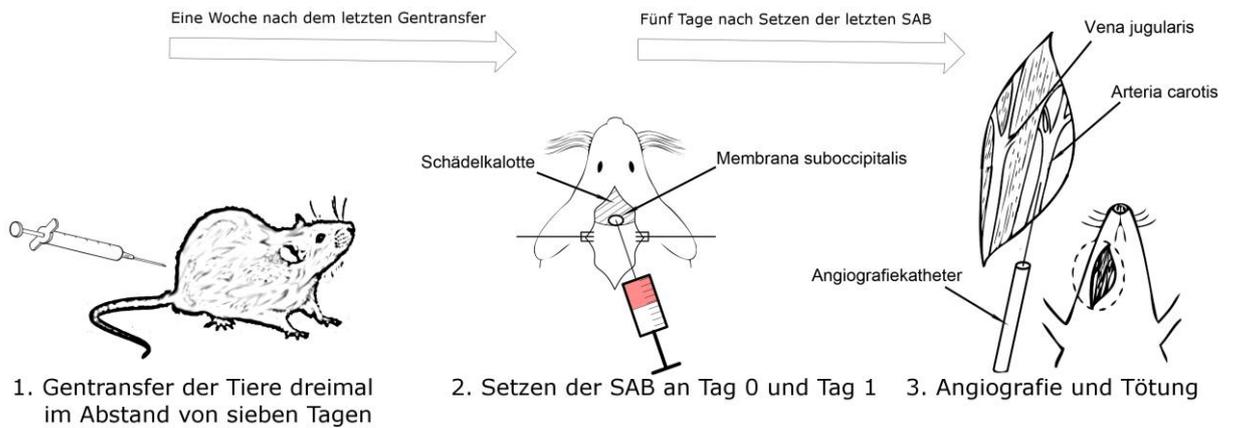


Abb.3: Schematische Darstellung des Versuchsablaufs. Schritt 2 zeigt die dorsale Präparation und Punktion der *Membrana suboccipitalis* (Membran zwischen Hinterhaupt und erstem Halswirbel). Schritt 3 zeigt die ventrale Präparation und Punktion der *A. carotis*.

Das Hirnparenchym wurde daraufhin mithilfe einer Hämatoxylin-Eosin Färbung und mithilfe von immunhistochemischen Färbungen (VEGF und CD34) feingeweblich untersucht.

2.3.1 SAB Modell der Ratte

Die Versuche wurde entsprechend dem von Prunell et al. [67] etabliertem Modell der Subarachnoidalblutung an der Wistar Ratte durchgeführt.

Das narkotisierte Tier wurde dazu mithilfe von Pflasterstreifen über den Extremitäten auf einem mit OP Tüchern bespanntem Brett fixiert. Mit einem Hautschnitt *suboccipital* und nach der Abpräparation der *nuchalen* Muskulatur wird die *atlantooccipitale* Membran (Bindegewebige Struktur zwischen dem Hinterhaupt und dem ersten Wirbel des Tieres) freigelegt. Dabei stellt die

Durchtrennung der *nuchalen* Muskulatur einen Umstand dar, der bei der weiteren Pflege der Tiere, insbesondere bei der Trinkwasserversorgung, berücksichtigt werden muss.

Anschließend erfolgte die Punktion der *Cisterna magna* mit einer 25-gauge Nadel (Sterican® Standardkanüle, Braun) durch die *atlantoccipitale* Membran hindurch und die Aspiration von 0.1 ml zerebro-spinaler Flüssigkeit. Die Punktionstechnik ist schematisch in Abbildung 4 dargestellt.

Darauf wurde zunächst die Schwanzarterie der Tiere gestaut, um eine bessere Blutentnahme zu gewährleisten. Es folgte die Anpunktion der Schwanzarterie mit der gleichen Kanüle, die auch für die Liquorentnahme verwendet wurde. Eine Aspiration von 0.4 ml Blut wurde ohne Verzug durchgeführt und sofort mit dem Liquor vermischt, um einer raschen Koagulation vorzubeugen. Es folgte die Injektion von 0.1 ml des Blut/ Liquorgemisches in die *Cisterna magna*. Im Anschluss wurden die Tiere für jeweils 10 min. in Kopftieflage gelagert, um eine gleichmäßige Verteilung des Blutes im Liquorraum zu gewährleisten.

Nach ausreichender Desinfektion erfolgte der Wundverschluss durch eine Einzelknopfnah. Diese Prozedur wurde jeweils an Tag null, also am Tag des letzten Gentransfers, und an Tag eins durchgeführt. Für die Scheinoperation ohne Injektion von Eigenblut wurde derselbe Zugang gewählt, anschließend 0,1 ml Liquor ebenfalls *suboccipital* aus der *Cisterna magna* aspiriert und dann wieder injiziert. 20 % der Tiere wurden als Verlust einkalkuliert. Dies wird insbesondere durch die Schwierigkeit der *suboccipitalen* Punktion erklärt.

Allein durch eine Irritation oder sogar Berührung des sehr empfindlichen Hirnstamms, der vor allem für die Steuerung von vegetativen Funktionen, also unbewusst ablaufenden Prozessen wie z.B. der regelmäßigen Atmung verantwortlich ist, kann es schon zu einer Beeinträchtigung lebenswichtiger Körperfunktionen kommen. Aus diesem Grund musste eine hohe Rate an Verlusten einkalkuliert werden.

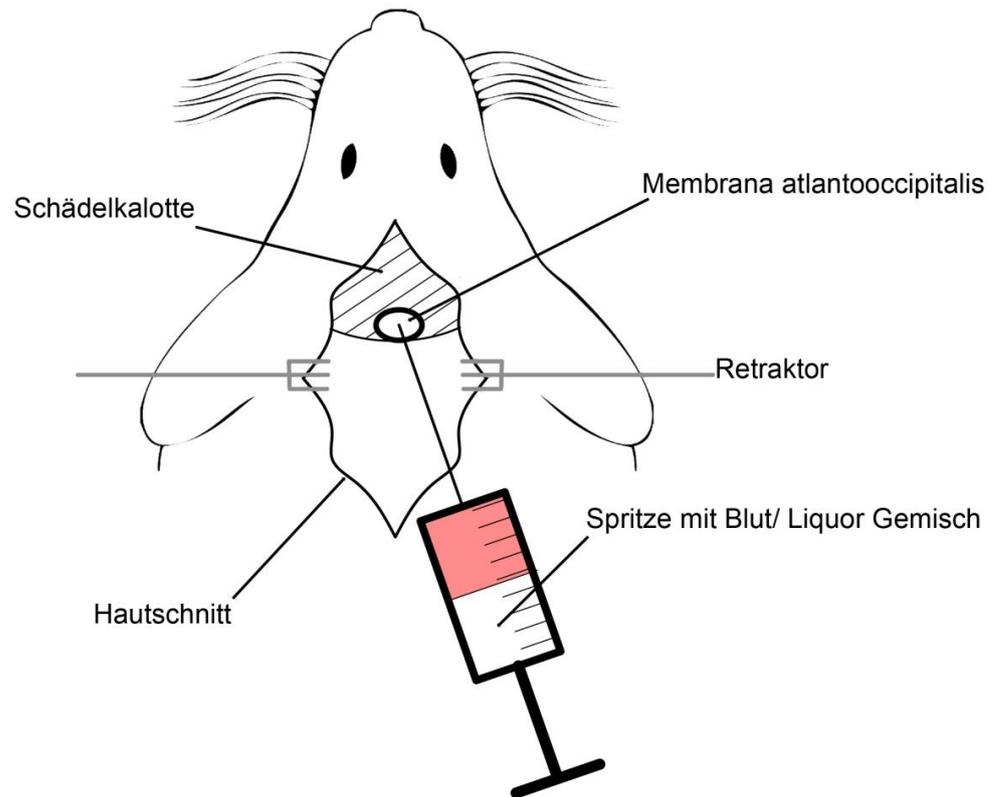


Abb. 4: Darstellung der *suboccipitalen* Punktion zum Setzen der SAB nach entsprechender Präparation.

2.3.2 Rahmenbedingungen der Tierversuche

2.3.2.1 Tierhaltung und Pflege

Für das Hauptexperiment wurden insgesamt 80 männliche Wistar-Ratten in der Gewichtsklasse 245-390g aus der Tierversuchsanlage (TVA) der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf verwendet. Bei dem Vorexperiment war die Zahl der Versuchstiere mit 32 deutlich kleiner.

Alle Tierversuche wurden nach den aktuellen Richtlinien durchgeführt und vom Landesamt für Natur-, Umwelt- und Verbraucherschutz, Recklinghausen genehmigt (Aktenzeichen 8.87-50.10.34.08.246). Die Versuchstierkunde des Autors wurde in der Tierversuchsanlage der Universität Düsseldorf erworben.

Es wurden maximal vier Tiere in einem durchsichtigen Polycarbonkäfig (Makrolon Standardkäfige) bei gleichbleibender Temperatur von 22°C +/- 2°C,

55%-iger +/- 5% Luftfeuchtigkeit und einem 12 Stunden Tag-Nachtrhythmus gehalten. Den Tieren wurde Futter (Pellets rats/mice maintenance # 1302, Altromin Spezialfutter GmbH und Co. KG, Lage, Deutschland) und Wasser ad libitum angeboten. Die Beaufsichtigung und Pflege der Tiere wurde durch das qualifizierte Pflegepersonal der TVA Düsseldorf übernommen. Die Angiografien (im Laufe des Hauptexperiments) und die anschließenden Entnahmen der Gehirne (bei Vor- und Hauptexperiment) erfolgten in den entsprechenden Einrichtungen der Neurochirurgie bzw. Neuroradiologie, wobei die Tiere in speziellen Boxen unter ständiger Aufsicht der Versuchsleiter transportiert wurden. Dabei wurde vor jeder Versuchsreihe darauf geachtet, den Tieren ausreichend Zeit zu geben (12h), sich in der neuen Umgebung unter stressfreien Bedingungen (von den Versuchsräumen getrennte, abgedunkelte Räume mit geräuscharmer Kulisse) zu akklimatisieren.

2.3.2.2 Anästhesie und Analgesie

Alle operativen Eingriffe wie die Implantation der Laserdopplersonden, die Blutentnahme, das Setzen der SAB, sowie die Angiografie wurden in Allgemeinanästhesie durchgeführt. Die Tiere wurden durch intraperitoneale Mischinjektion von 10%-igem Ketaminhydrochlorid (Ketavet® , Warner-Lambert, Baar, Germany) 80-130 mg/kg Körpergewicht entsprechend 0,8-1,3 ml/100g Körpergewicht und 5%-igem Xylazine-Hydrochlorid (Rompun®, Bayer HealthCare AG, Division Animal Health, Monheim, Deutschland) 4 ml/100kg Körpergewicht in tiefe Narkose versetzt. Die Narkosetiefe wurde stets durch das Ausbleiben einer Reaktion auf das Setzen von Schmerzreizen gesichert, bevor der eigentliche Eingriff erfolgte. Durch Wärmematten und rektale Temperaturmessungen wurde eine konstante Körpertemperatur von etwa 37°C sichergestellt. Die postoperative Analgesie erfolgte durch subkutane Applikation von 5 mg/kg Körpergewicht Caprofen (Rimadyl®, Pfizer, Berlin, Deutschland) am narkotisierten Tier.

2.3.2.3 Gentransfer

Es wurde jeweils eine Gruppe der Tiere mit dem VEGF-Plasmid, eine mit dem Kontrollplasmid ohne VEGF-Gen und eine dritte Gruppe mit 0,9% physiologischer Kochsalzlösung behandelt.

Jeweils 100µg DNA gelöst in 50µl physiologischer Kochsalzlösung bzw. das gleiche Volumen Kochsalzlösung wurden in den *M. tibialis anterior* injiziert. Der Gentransfer erfolgte insgesamt dreimal im Abstand von jeweils einer Woche. Eine Narkose war hierfür nicht notwendig. Vor jeder Injektion erfolgte außerdem eine Gewichtskontrolle der Tiere.

2.3.2.4 Tötung der Tiere und Hirnentnahme

Noch in Narkose erfolgte die Tötung der Tiere durch transkardiale Perfusion. Diese erfolgte in tiefer Anästhesie der Tiere bei erhaltener hämodynamisch wirksamer Pumpfunktion des Herzens. Nach Öffnung des Brustkorbs wurde der rechte Vorhof zwecks Druckentlastung eingeschnitten. Der *Apex cordis* wurde mit einer spitzen Schere abgesetzt, dann eine Butterfly-Kanüle über den linken Ventrikel bis zur *Aorta ascendens* eingeführt und mit einer Klemme fixiert. Die Perfusion erfolgte mit je 50 ml körperwarmer PBS-Puffer (Roche Diagnostics GmbH) und gekühlter 4% Paraformaldehydlösung (Carl Roth GmbH+ Co. KG).

Zur Entnahme der Gehirne wurde ein medianer Hautschnitt von 3–4cm entlang der *Sutura sagittalis* gemacht. Mit scharfem Skalpell wurde Nacken- und Temporalmuskulatur abgesetzt. Die Schädelkalotten konnte dann mit der Knochenzange entfernt und die Gehirne herausgenommen werden.

Die Kadaver wurden speziellen Behältern der Tierversuchsanlage zugeführt und hier sachgemäß entsorgt.

2.3.3 Angiografie

Am Tag 5 nach Setzen der ersten SAB erfolgte die Angiografie, da hier die maximale Ausprägung der Vasospasmen erwartet wurde [67]. Zunächst wurden

die Tiere hierzu in die Neurochirurgischen OP-Laboratorien verbracht und es wurde ihnen ausreichend Zeit gegeben sich an die neue Umgebung zu gewöhnen.

Unter Anästhesie wurden die auf dem Rücken liegenden Ratten im rasierten Operationsgebiet von *submandibulär* bis zum *Jugulum* in der Halsmitte längs inzidiert. Nach stumpfer Präparation in die Tiefe erfolgte die Darstellung und gleichzeitige Separation des *M. sternokleidomastoideus* und der *prätrachealen* Muskulatur. Unter dem Mikroskop konnte die Gefäß-Nerven-Scheide zwischen den separierten Muskeln dargestellt werden. Vorsichtig wurde dann unter Schonung des *N. vagus* die *A. carotis communis* freigelegt und über ihre *Bifurkation* hinaus nach *kranial* präpariert. Im weiteren Verlauf wurde die *A. carotis communis* unterfahren und mit einer Vinylschlinge angeschlungen.

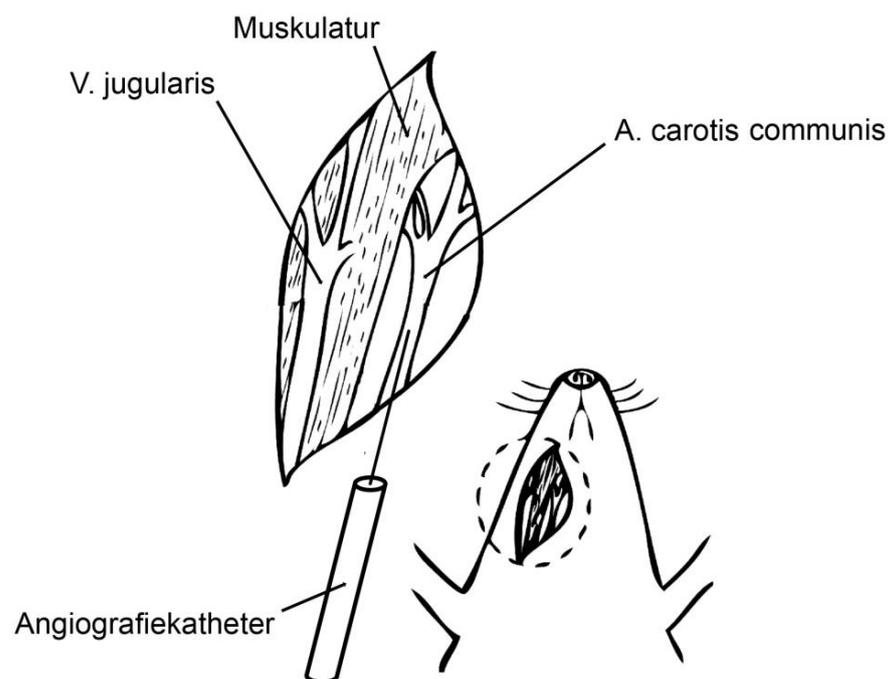


Abb. 5: Schematische Darstellung der Punktion der *A. carotis communis* nach entsprechender Präparation von ventral.

In diesem Zustand wurden die Tiere in die benachbarte Angiografieeinrichtungen der Neuroradiologie Düsseldorf verbracht. Hier wurde die *A. carotis* mit einem extra modifizierten Angiografiekatheter punktiert (siehe

Abbildung 5). Zur Herstellung des Angiografiekatheters wurde eine 27-gauge Nadel (Braun Melsungen AG) am Ende eines Prowler 14 Mikrokatheters (Cordis Europe, Johnson & Johnson Medical N.V./S.A. Waterloo Office Park, Dreve Richelle 161 H, B-1410 Waterloo, Belgien), speziell für endovaskuläre Untersuchungen, angebracht. Nach erfolgreicher Punktion wurden dann 0,1 ml Kontrastmittel (Ultravist 300, Schering, Deutschland) automatisch kontrolliert in das Gefäß injiziert. Das An- und Abfluten wurde nun im Sinne einer DSA (digitale Subtraktionsangiografie) mit dem Gerät der Klinik für Neuroradiologie (Integris Allura, Philips, Niederlande) dokumentiert. Der Aufnahmevorgang musste dabei bei jedem Tier bis zu viermal wiederholt werden um unvermeidbare Artefakte soweit wie möglich zu reduzieren.

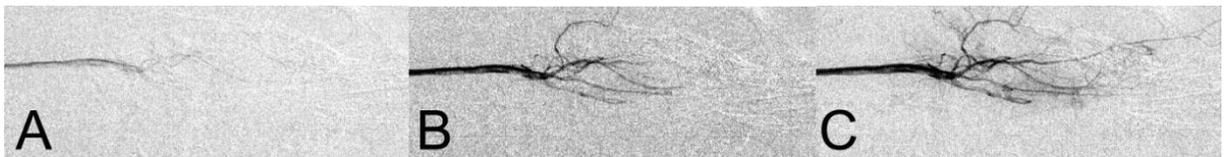


Abb. 6: Beispiel für die DSA Aufnahme bei einer Ratte. Nach und nach erreicht das Kontrastmittel auch die kleinsten Endäste des Gefäßsystems.

Die Datensätze der DSA Sequenzen wurden im Hinblick auf die Makroperfusion (beschreibt die Durchblutung in den größeren hirnersorgenden Arterien) und die Mikroperfusion (Durchblutung in den kleineren Gefäßen, den sog. Arteriolen) analysiert. Um die Makroperfusion zu untersuchen, wurden festgelegte Gefäßsegmente in den Datensätzen mit Hilfe einer vor Ort neu entwickelten Software vermessen (AngioTux, Institute für Informatik, Institut für Neuroradiologie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf) [68]. Hierbei wurden für jedes untersuchte Gefäß die Grauwerte bestimmt, die mit dem jeweiligen Gefäßdurchmesser korrelieren.

Wir konzentrierten uns bei der Auswertung auf den Durchmesser der *A. carotis interna*. Um interindividuelle Unterschiede der einzelnen Tiere zu

berücksichtigen, wurde der Durchmesser des untersuchten Gefäßes als Anteil in Prozent am Durchmesser der *A. stapedia* des jeweiligen Tieres angegeben. Bei der *A. stapedia* handelt sich dabei um ein *extrakranielles* Gefäß, das außerhalb des Subarachnoidalraumes aus der *A. carotis* abzweigt. Somit wird die *A. stapedia* durch die SAB nicht affektiert, aber ebenfalls von dem applizierten Kontrastmittel perfundiert und kommt in der DSA dadurch zur Darstellung.

Um die Mikroperfusion zu bestimmen wurden bestimmte Regionen definiert, (ROI=*Region of Interest*) in denen eine Pixelanalyse durchgeführt wurde. Als „*major ROI*“ wurden dabei bestimmte Regionen des Marklagers definiert, während „*cortical ROI*“ definierte Regionen des *Kortex* (Hirnrinde) bezeichnet. Dabei wird angenommen, dass die Pixelzahl in dem definierten Gebiet mit dem von Kontrastmittel durchfluteten Gefäßen und perfundiertem Gewebe korreliert. Eine höhere Zahl von Pixeln bedeutet somit eine größere Zahl von Gefäßen und ist damit ein indirekter Indikator für die Neubildung von Gefäßen (Neoangiogenese). Zur verbesserten graphischen Darstellung wurde die Pixelzahl als „Minimal intensive Projektion“ dargestellt, ein Wert umgekehrt proportional zur eigentlichen Pixelzahl und somit auch umgekehrt zur Gefäßdichte.

2.3.4 Histologische Auswertung

2.3.4.1 Gewebefixierung

Die entnommenen Gehirne wurden sofort in eine 4%ige Formaldehydlösung verbracht, um postmortale Veränderungen zu verhindern. Es folgte eine Inkubation in selbiger Lösung bei 4°C über 24 Stunden. Durch die Fixierung wurde das zuvor weiche Gehirn erhärtet und konnte nun in die Hirnregionen zugeschnitten werden. Dabei wurden bei jedem Hirn *coronare* Schnitte durch die *Frontal-*, die *Parietal-* und die *Occipitalregion* vorgenommen.

2.3.4.2 Herstellung der Paraffinpräparate

Die zurechtgeschnittenen Gewebestücke wurden nun in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert und anschließend mit 60°C heißem Paraffin

übergossen. Die erkalteten Paraffinblöcke wurden dann mithilfe eines Schlittenmikrotoms in 4µm dünne Schichten geschnitten, im Wasserbad bei 50°C zur Entfaltung gebracht, auf die entsprechenden Objektträger aufgetragen und über Nacht bei 37°C getrocknet.

Anschließend wurden die Gewebepreparate unterschiedlichen Färbemethoden unterzogen.

2.3.4.3 Hämatoxylin-Eosin (HE) Färbung

Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung) ist eine histologische Standardfärbemethode zur Darstellung von feingeweblichen Strukturen, bestehend aus zwei einzelnen Färbetechniken. Mit Hämatoxylin werden dabei alle basophilen Strukturen wie die DNA der Zellkerne und die Ribosomen des rauen endoplasmatischen Retikulums blau angefärbt, mit Eosin hingegen alle Proteinstrukturen rot. Damit bietet auch die HE-Färbung eine gute Übersicht über das Präparat und die Möglichkeit infarzierte Areale zu bestimmen. Das etablierte Standardprotokoll für neuropathologische Präparate wurde befolgt.

2.3.4.4 Immunhistochemische Färbungen

Immunhistochemische Färbungen beruhen auf der Bindung eines spezifischen primären Antikörpers mit einem entsprechenden Antigen (meist Proteinstrukturen). Der an das Antigen gebundene primäre Antikörper wird im Anschluss durch einen sekundären Antikörper detektiert. Dieser sekundäre gebundene Antikörper katalysiert die Reaktion eines sogenannten Chromogens zu einem farbigen Endprodukt. Wir verwendeten AEC (3-Amino-9-Ethylcarbazol) als Chromogen, welches ein rosafarbenes Endprodukt liefert. Nach Gegenfärbung des gesamten Präparates mit Hämatoxylin werden so die Regionen mit Vorkommen des entsprechenden Antigens dargestellt. In unserer Auswertung verwendeten wir zwei verschiedene Antikörper, einen gegen das VEGF-Protein und einen gegen das transmembranäre Glykoprotein CD34. Für die oben beschriebene Detektion und Färbung der gebundenen primären Antikörper stehen sog. *Tissue staining kits* mit entsprechendem Protokoll zur

Verfügung. Alle für den Färbeprozess benötigten Reagenzien sind Bestandteil des Anti-Goat HRP-AEC Cell & Tissue Staining Kits (R&D Systems, Inc., Minneapolis, USA). Aufgrund der sehr speziellen Gewebeeigenschaften der von uns untersuchten Gehirne musste das Protokoll zunächst optimiert werden. Folgendes Protokoll wurde dann verwendet:

Um die Präparate zu schützen wurden alle Schritte in einer Feuchtkammer durchgeführt.

1. Bedecken des Präparates mit drei Tropfen Peroxidase *Blocking Reagent* und für fünf Minuten einwirken lassen.
2. Vorsichtiges Waschen mit Waschpuffer für fünf Minuten.
3. Präparat für 15 Minuten mit drei Tropfen *Serum Blocking Reagent D* inkubieren. Drei Minuten trocknen lassen und anschließend überschüssigen Puffer abwischen.
4. Präparat für 15 Minuten mit *Avidin Blocking Reagent* inkubieren, Überschuss vorsichtig entfernen.
5. Präparat für 15 Minuten mit 3 Tropfen *Biotin Blocking Reagent* inkubieren, Überschuss vorsichtig entfernen.
6. Präparat für 24 Stunden mit primärem Antikörper inkubieren. Präparat anschließend dreimal für insgesamt 15 Minuten in Pufferbad waschen.
7. Präparat für 60 Minuten mit drei Tropfen *mit Biotinylated Secondary Antibody* inkubieren. Erneut dreimal für insgesamt 15 Minuten in Pufferbad waschen, anschließend vorsichtig trocknen.
8. Präparat für 30 Minuten mit HSS-HRP inkubieren, danach dreimal für jeweils zwei Minuten im Pufferbad waschen.
9. Jedes Präparat mit 200µl *AEC Chromogen Solution* für 18 Minuten inkubieren.
10. Für 5 Minuten in destilliertem Wasser waschen.
11. Gegenfärbung mit Hämatoxylin nach Standardprotokoll.

2.3.4.4.1 VEGF Antikörper

Bei dem von uns verwendeten Anti-rat VEGF Antikörper (R&D Systems, Inc.) handelt es sich um einen von einer Ziege stammenden IgG Antikörper, der gegen das VEGF₁₆₄ Protein gerichtet ist. Er wurde in einer Konzentration von 15µg/ml verwendet und der Antikörper wurde entsprechend den Vorgaben des Herstellers rekonstituiert und gelagert.

2.3.4.4.2 CD34 Antikörper

Hierbei handelt es sich um einen IgG Antikörper einer Ziege gegen das CD34 Protein der Ratte (R&D Systems, Inc.).

Bei dem CD34 Protein handelt es sich um ein membranständiges Glykoprotein in der Zellmembran von hämatopoetischen (an der Bildung von Blutzellen beteiligten) Stammzellen und von Endothelzellen.

Der Antikörper wurde in einer Konzentration von 15 µg/ml verwendet und nach den Angaben des Herstellers rekonstituiert und gelagert.

3 Ergebnisse

3.1 Vorexperiment

Das Vorexperiment, in dem der Effekt von VEGF Plasmiden auf die Auswirkungen eines Schlaganfalls untersucht werden sollte, zeigte unter Cresyl-Violett Färbung eine statistisch signifikante Reduktion des Infarkt Volumens in den mit VEGF Plasmiden transferierten Tieren (43% Reduktion, $p < 0.05$, Mann-Whitney Test).

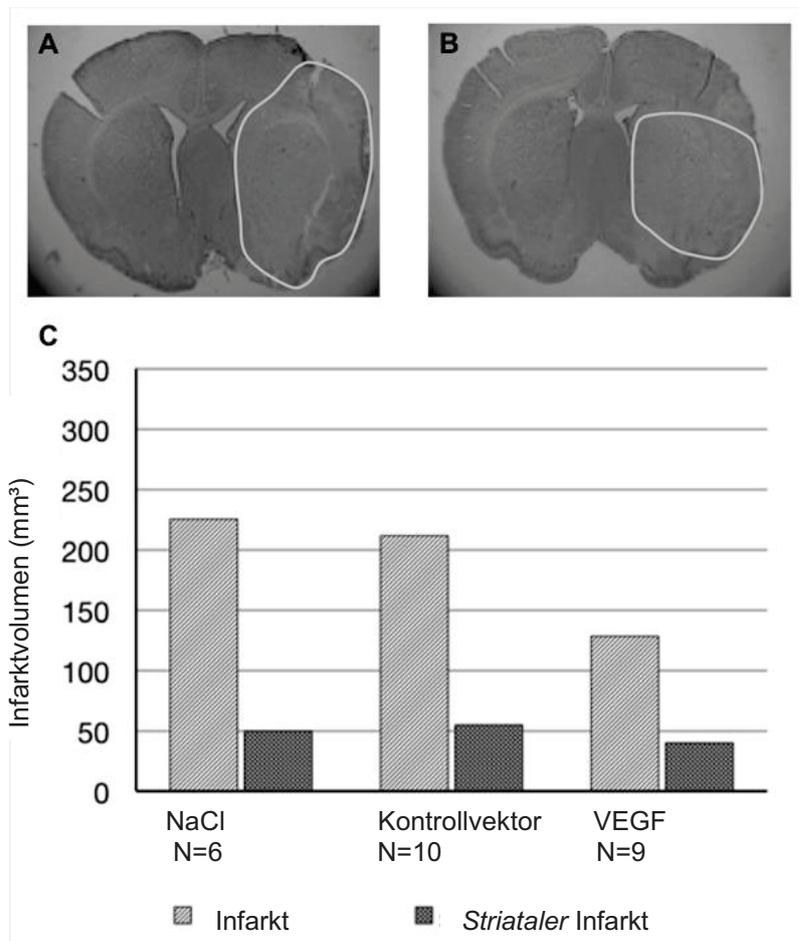


Abb. 7: Cresyl-Violett Färbung nach 45 Minuten Ischämiezeit (tMCAO) und 24 Stunden Reperfusion. **A:** Ischämische Hirnschädigung nach intramuskulärer Injektion von 0,9 % NaCl. **B:** Abgeschwächte ischämische Hirnläsion nach intramuskulärer Applikation von VEGF Plasmiden. **C:** Infarkt Volumen (*territorial* und *striatal*) in den drei verschiedenen Gruppen in mm³.

Fünf Tiere verstarben durch das akzidentelle Auftreten einer SAB, zwei weitere durch den Schlaganfall selbst, so dass 25 Hirne analysiert werden konnten. Dabei stammten neun Tiere aus der mit VEGF Plasmiden gentransferierten Gruppe, zehn aus der mit dem Kontrollvektor behandelten Gruppe und sechs aus der Gruppe die 0.9% Kochsalzlösung erhalten hatte (Abbildung 7).

Die TUNEL Färbung zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen.

3.2 Hauptexperiment

3.2.1 Klinische Evaluation

Insgesamt wurden 80 Tiere in zwei Versuchsreihen untersucht. Nach dem Setzen der SAB verstarben insgesamt 24 der Tiere und im weiteren Verlauf des Experiments nochmals 12 Tiere. Somit konnten insgesamt 44 Hirne erfolgreich analysiert werden. Dabei stammten 18 Hirne aus der mit dem VEGF Vektor behandelten Gruppe, 14 Hirne aus der mit dem Kontrollvektor transferierten Gruppe, 8 Hirne aus der mit NaCl injizierten Gruppe und 4 Hirne aus der scheinoperierten Gruppe.

Die klinische Evaluation im Beobachtungszeitraum zwischen dem Setzen der SAB und der Angiographie mit anschließender Tötung der Tiere zeigte bei einem Tier prolongierte neurologische Defizite im Sinne einer Hemiparese. Des Weiteren traten bei allen Tieren unspezifische Symptome wie Gewichtsverminderung und Appetenzverlust auf.

3.2.2 Angiographische Auswertung

Insgesamt wurden 176 angiographische Untersuchungen an den 44 Rattenhirnen aus den vier Versuchsgruppen durchgeführt. Da die Angiographie in einigen Fällen aufgrund technischer Probleme nicht durchführbar war, oder die Tiere während der Angiographie verstarben, war die Auswertung der Angiographie bei 18 Tieren nicht möglich. Insgesamt waren 96 Serien aus 26

Tieren in Durchführung und Datenerfassung erfolgreich. Dabei wurde für jedes Individuum das Angiogramm mit der prominentesten Gefäßdarstellung für die weitere Analyse ausgewählt.

3.2.2.1 Makroperfusion

In den Versuchsgruppen mit SAB-Modell wurde eine statistisch signifikante Reduktion des relativen Gefäßdurchmessers der *A. carotis interna* induziert (SAB-Gruppen gegenüber der scheinoperierten Gruppe, $p=0.0117$, t-test).

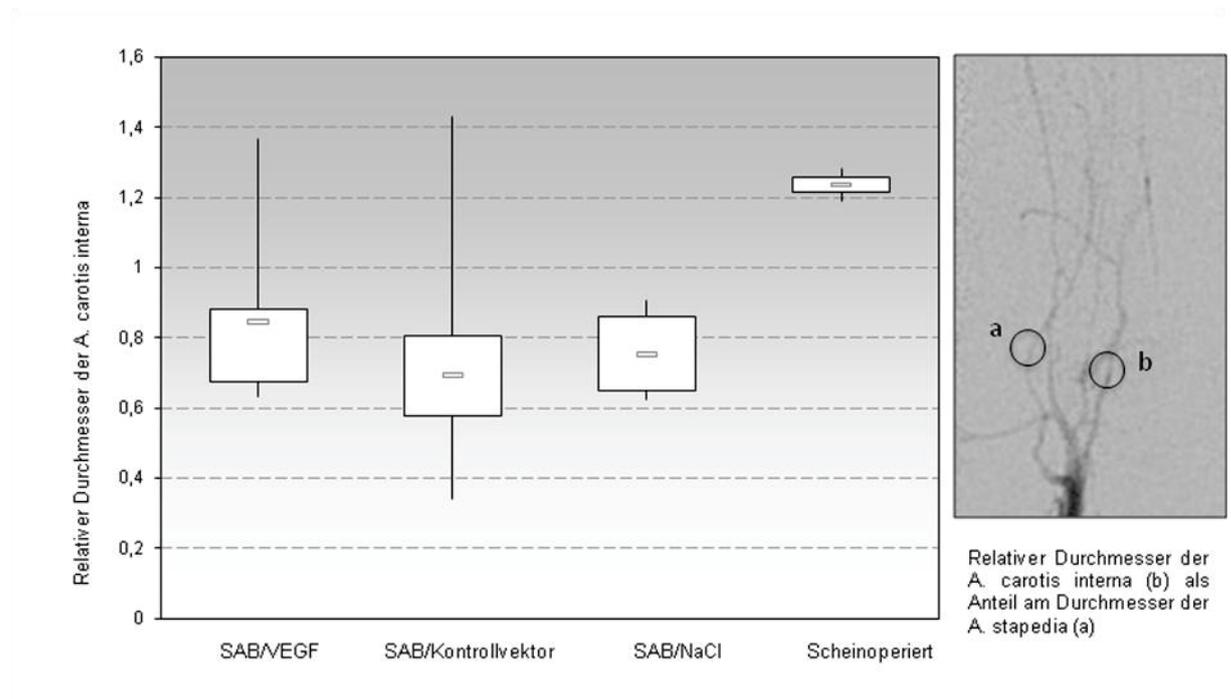


Abb. 8: Der relative Durchmesser der *A. carotis* gegenüber der jeweiligen *A. stapedia*. Als Beispiel zeigt die rechte Abbildung beide Gefäße in der Angiografie bei der Ratte.

Innerhalb der drei einzelnen SAB Gruppen gab es keine statistisch signifikanten Unterschiede des relativen Gefäßdurchmessers (SAB/VEGF-Vektor Gruppe im Vergleich mit der SAB/Kontrollvektor Gruppe, $p=0.56$; SAB/VEGF-Vektor Gruppe im Vergleich mit der SAB/NaCl Gruppe, $p=0.51$, t-test) (siehe Abbildung 8).

3.2.2.2 Mikroperfusion

Um ein indirektes Maß für die Neoangiogenese in einem als *Region of Interest* definierten Areal zu erhalten wurde wie oben beschrieben eine Annäherung über die zur Gefäßdichte umgekehrt proportionale Minimal Intensive Projektion gewählt. Es wurden 26 Serien für 26 Tiere mit vollständiger Darstellung von der arteriellen Phase bis zur Parenchymphase ausgewertet. Wie in Abbildung 9 und 10 zu sehen, zeigte sich ein statistisch signifikanter Unterschied der VEGF-Vektor/ SAB Gruppe sowohl gegenüber der Kontrollvektor/SAB als auch gegenüber der NaCl/SAB Gruppe (*major ROI*: $p=0.013$ und $p=0.007$; *cortical ROI*: $p=0.013$ und $p=0.004$, t-test).

Der Unterschied zwischen der VEGF-Vektor/SAB Gruppe und der scheinoperierten Gruppe war nicht statistisch signifikant (*major ROI*: $p=0.94$; *cortical ROI*: $p=0.63$, t-test).

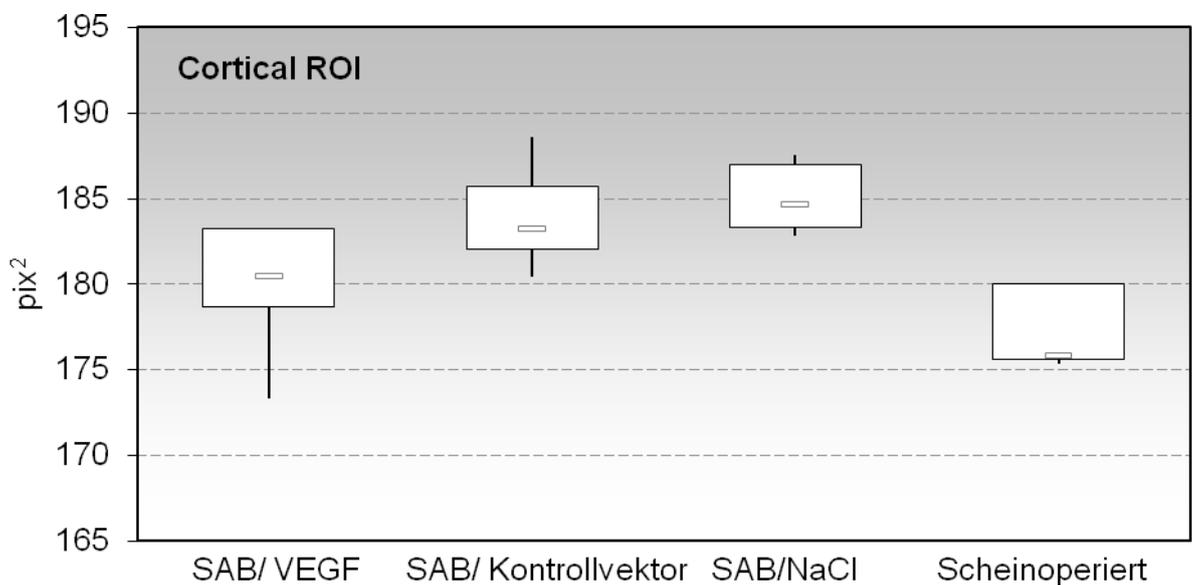


Abb. 9: Die „minimal intensive Projektion“ (pix^2) für die einzelnen Versuchsgruppen in den untersuchten Bereichen des *Kortex* („*cortical ROI*“).

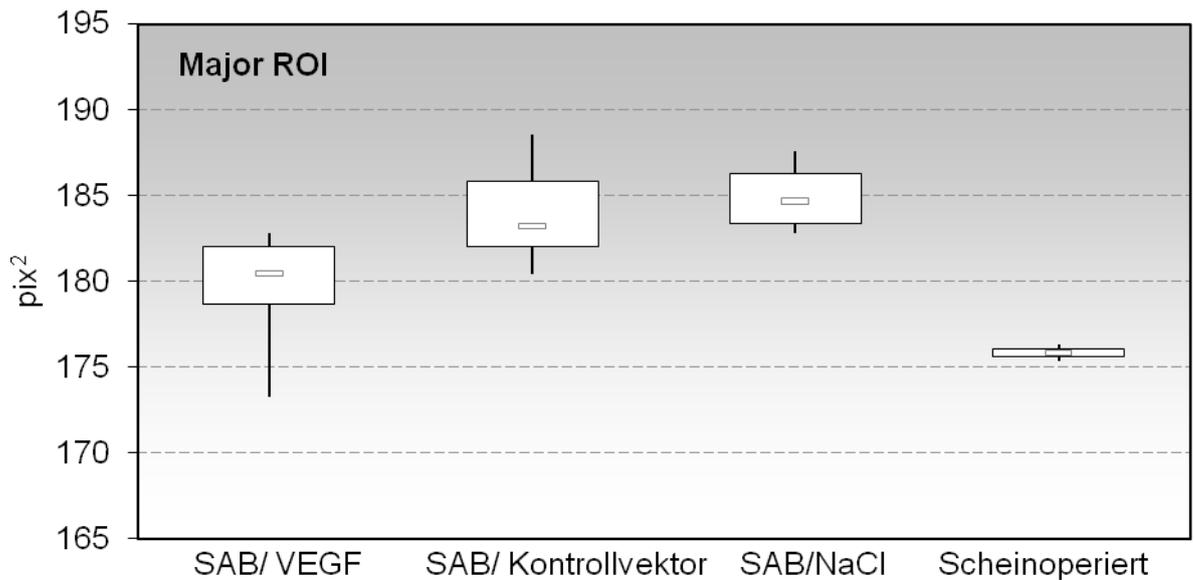


Abb. 10: Die „minimal intensive Projektion“ (pix²) für die einzelnen Versuchsgruppen in den untersuchten Bereichen des Marklagers („major ROI“).

3.2.3 Ergebnisse der morphologischen Auswertung

3.2.3.1 HE Übersichtsfärbung

In der makroskopischen pathologischen Evaluation der mit Hämatoxylin Eosin gefärbten Schnitte zeigten sich in 26 Hirnen eindeutig Rückstände einer Subarachnoidalblutung. Alle 26 Hirne gehörten zu Tieren aus der SAB Gruppen. In der scheinoperierten Gruppe zeigten sich in keinem der Hirne Rückstände einer SAB.

Histologisch wurden in den Hirnen der VEGF-Vektor/SAB Gruppe und in den Hirnen der scheinoperierten Gruppe keine Infarktareale beobachtet (siehe Abbildung 11). Es zeigten sich kleine Infarktareale im Sinne einer durch Vasospasmen induzierten ischämischen Läsion in der Kontrollvektor/SAB Gruppe ($p=0.051$) und in der NaCl/SAB Gruppe ($p=0.095$).

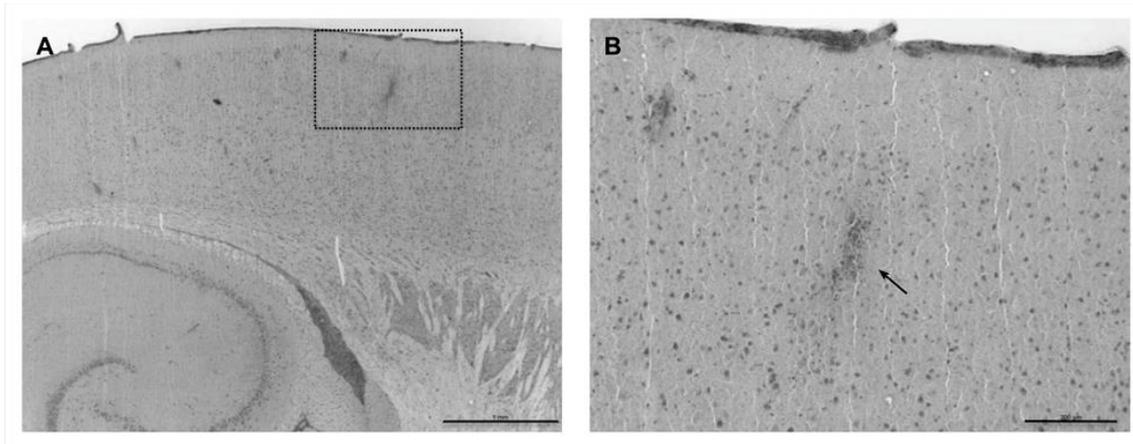


Abb. 11: Ein HE gefärbter Schnitt mit kortikalen Mikroinfarkten in einem nicht behandelten Tier (A). Bei stärkerer Vergrößerung sind Infiltrationen von mononukleären Zellen zu erkennen (B, Pfeil). Der Maßstab entspricht 1000 μm (A) bzw. 200 μm (B).

3.2.3.2 Immunhistochemie

Die Immunhistochemische Färbung mit Anti-VEGF Antikörpern zeigte einen statistisch signifikanten Unterschied der VEGF/SAB Gruppe gegenüber der Kontrollvektor/SAB Gruppe ($p=0.036$) und im Vergleich zur NaCl/SAB Gruppe ($p=0.01$).

Zwischen VEGF/SAB Gruppe und der scheinoperierten Gruppe fand sich kein statistisch signifikanter Unterschied ($p=0.7$).

Die immunhistochemische Färbung mit Anti CD34 Antikörpern zeigte einen klaren, aber statistisch nicht signifikanten Trend zur Hochregulation der Neoangiogenese in der VEGF/SAB Gruppe sowohl im Vergleich zur Kontrollvektor/SAB Gruppe ($p=0.117$) als auch gegenüber der NaCl/SAB Gruppe ($p=0.1$) und der scheinoperierten Gruppe ($p=0.07$).

4 Diskussion

4.1 Das SAB Modell der Ratte

Wie zuvor beschrieben entschieden wir uns in der vorliegenden Arbeit für die Induktion einer verzögerten zerebralen Ischämie durch das „*double haemorrhage* SAB Modell“ an der männlichen Wistar Ratte nach Prunell et. al [67]. Dabei wird das Blut an zwei hintereinander folgenden Tagen in die *Cisterna magna* der Tiere injiziert.

Andere Modelle arbeiten beispielsweise mit dem Herbeiführen einer SAB durch endovaskulär gesteuerte Perforation der *A. carotis interna* [69] oder Bohrlochreparation und gezielte Durchtrennung der *A. basilaris* (Hauptversorgungsarterie des hinteren Hirnkreislaufs) [70]. Wie durch Prunell et al. [67] gezeigt werden konnte, liefert das von uns gewählte Modell jedoch den höchsten Grad an Vasospasmen und damit die höchste Ischämiebelastung und schien somit optimal.

Wie in vorangehenden Publikationen deutlich gemacht werden konnte, erreicht die SAB induzierte Ischämie am fünften Tag nach Setzen der SAB ihre maximale Ausprägung [44, 67, 71], deshalb wählten wir diesen Zeitpunkt zur Angiographie und anschließenden histologischen Untersuchung der Tiere.

Kritisch ist dabei die Tatsache zu betrachten, dass wir uns beim *Monitoring* der Tiere auf Körpertemperatur und Körpergewicht beschränken mussten. Weitere Parameter wie z.B. der Blutdruck und metabolische Parameter, wie die arteriovenöse Sauerstoffdifferenz oder der *zerebrale* Sauerstoffverbrauch, die in den Modellen von Prunell et al. [67] Anwendung fanden, konnten nicht berücksichtigt werden. Dieses zunehmend invasive *Monitoring* hätte nicht nur einen unverhältnismäßigen technischen Aufwand, sondern v.a. eine deutlich höhere Belastung der Tiere bedeutet.

Aufgrund der zahlreichen Risiken im vorliegenden SAB Modell, v.a. bei der hirnstammnahen Eigenblutinjektion, ist die Sterblichkeitsrate der Versuchstiere

sehr hoch. In der vorliegenden Studie lag sie bei 30% und ist damit vergleichbar mit anderen Studien, die dasselbe Modell verwendeten [67, 72, 73].

4.2 Angiographisch messbare Effekte

Die Evaluation angiographischer Daten aus der Untersuchung von Ratten ist aufgrund der geringen Größe der Versuchstiere sehr komplex, dementsprechend viele Techniken wurden entwickelt und untersucht [74-76].

Speziell für das SAB Modell bei Ratten wurde in der Neuroradiologie Düsseldorf ein auf einem Computerprogramm basierendes digitales Messwerkzeug zur Bestimmung der Durchmesser der Hirnarterien entwickelt. In einer Studie konnte von Turowski et al. [68] gezeigt werden, dass dieses neue Instrument eine zuverlässige Messmethode darstellt. Darüber hinaus fand sich die nötige Expertise und Erfahrung zur Durchführung der technisch anspruchsvollen Angiographie und der dazugehörigen Auswertung direkt vor Ort.

Wie zuvor beschrieben, zeigte sich im Hinblick auf die Makroperfusion in der Auswertung ein statistisch signifikant verringerter Gefäßdurchmesser in allen drei SAB-Gruppen gegenüber der scheinoperierten Gruppe ($p=0.017$, t-test). Die drei SAB-Gruppen untereinander zeigten keine signifikanten Unterschiede (SAB/VEGF-Vektor Gruppe im Vergleich zur SAB/Kontrollvektorguppe: $p=0.56$; SAB/VEGF-Vektor Gruppe gegenüber der SAB/NaCl Gruppe $p=0.51$, t-test). Dies spricht für eine relevante Induktion von Vasospasmen durch die künstlich zugefügte SAB, und somit ein erfolgreiches SAB Modell.

Außerdem zeigt sich in der SAB/VEGF-Vektor Gruppe kein eindeutiger Effekt im Sinne einer verbesserten Makroperfusion gegenüber den beiden anderen SAB Gruppen. Der VEGF Gentransfer zeigt also keinen Einfluss auf die Ausprägung der nach SAB auftretenden Vasospasmen, dies entsprach unseren anfänglichen Erwartungen.

Im Bezug auf die Mikroperfusion bedienen wir uns wie oben erläutert der minimal intensiven Projektion als umgekehrt proportionalem Wert zur Gefäßdichte und somit als indirektes Maß für die Neoangiogenese in fest

definierten Hirnarealen. Wie im Ergebnisteil beschrieben, zeigte sich ein statistisch signifikanter Unterschied der VEGF-Vektor/ SAB Gruppe sowohl gegenüber der Kontrollvektor/SAB als auch gegenüber der NaCl/SAB Gruppe (*major* ROI: $p=0.013$ und $p=0.007$; *cortical* ROI: $p=0.013$ und $p=0.004$, t-test). Der Unterschied zwischen der VEGF-Vektor/SAB Gruppe und der scheinoperierten Gruppe war nicht statistisch signifikant (*major* ROI: $p=0.94$; *cortical* ROI: 0.63, t-test). Es zeigt sich somit ein erhöhtes Maß an Neoangiogenese in den Hirnen der SAB/VEGF-Vektor Gruppe gegenüber den beiden anderen SAB Gruppen. Daher ist anzunehmen, dass die Injektion der VEGF Plasmide die Neoangiogenese erwartungsgemäß gesteigert hat. Interessanterweise findet sich kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen dem Ausmaß an Neoangiogenese in der SAB/VEGF-Vektor Gruppe und der scheinoperierten Gruppe. Erklärungsansätze sind hier rein hypothetischer Natur. Möglich wäre, dass die scheinoperierte Gruppe nie in der Hirnperfusion beeinträchtigt war, die SAB-Gruppen allerdings bedingt durch den Vasospasmus generell weniger stark perfundiert wurden. Die VEGF induzierte Neoangiogenese konnte die Perfusion dann jedoch soweit gegenüber den anderen beiden SAB Gruppen anheben, dass wieder das Perfusionsniveau der scheinoperierten Gruppe, also im Prinzip der Normalzustand, erreicht, bzw. aufrechterhalten werden konnte.

Kritisch bleibt anzumerken, dass verschiedene Parameter während der Angiographie das Anfluten des Kontrastmittels beeinflussen, v.a. die „*time to peak*“, also die Zeit bis zur maximalen Anflutung, ist für die Messung dabei von Interesse. Die Anflutungszeit des Kontrastmittels wiederum ist dabei von Bedeutung für den Kontrast in der Bildgebung, der zu einem definierten Zeitpunkt gemessen wird. Der Kontrast wiederum wurde dann als indirektes Maß für die Neoangiogenese verwendet. Unterschiede in der Anflutungszeit könnten also zu unterschiedlichen Messergebnissen führen, obwohl die eigentliche Gefäßzahl gleich ist.

Berücksichtigt wurde dies z.B. dadurch, dass die Injektion des Kontrastmittels automatisiert wurde. Allerdings sind noch weitere Faktoren für die

Anflutungszeit des Kontrastmittels zu berücksichtigen, v.a. der systemische und zerebrale Blutdruck. Um die tatsächliche Perfusion genauer bestimmen zu können wäre die Untersuchung mittels Perfusions-CT (Computertomographie) oder Perfusions-MRT (Magnetresonanztomographie) erstrebenswert. Sie scheitert allerdings bisher an der technischen Umsetzung im Tiermodell.

4.2.1 Morphologische Effekte

Die morphologische Analyse der mit HE gefärbten Schnitte zeigte deutliche Blutrückstände in den *basalen Cisternen* der Tiere aus den SAB Gruppen, dagegen fanden sich keine solche Rückstände in den Tieren aus der scheinoperierten Gruppe. Ein weiterer Anhaltspunkt für die erfolgreiche Durchführung des SAB Modells.

In der Analyse von Rattenhirnen aus SAB Modellen taucht stets ein ähnliches Problem auf. Zwar lässt sich häufig ein angiographisch dokumentierter Vasospasmus erzeugen, jedoch zeigen die meisten Tiere trotzdem keinerlei eindeutige ischämische Läsionen [77], wie sie etwa in Schlaganfallmodellen auftreten. Beim Menschen andererseits wäre bei vergleichbaren Vasospasmen durchaus mit ischämischen Läsionen in der cCT Diagnostik zu rechnen. Ähnlich zeigten sich auch die Ergebnisse in unseren Versuchsreihen, so zeigten lediglich wenige Tiere aus der SAB/Kontrollvektorgruppe ($p=0.51$) und aus der SAB/NaCl Gruppe ($p=0.095$) eine insgesamt statistisch nicht signifikante Anzahl an kleineren ischämischen Läsionen in der HE Färbung.

4.2.2 Anti-VEGF Antikörper

Die Färbung mit Anti-VEGF-Antikörpern diente v.a. der Beurteilung der VEGF Synthese. Hierbei fand sich eine erhöhte Steigerung der VEGF Expression in der SAB/VEGF-Vektor Gruppe gegenüber den beiden anderen SAB Gruppen. Ein Indiz für die gute Penetration und erfolgreiche Expression des applizierten Plasmids. Auf der anderen Seite fand sich kein signifikanter Unterschied in der Expression von VEGF zwischen der SAB/VEGF-Vektor Gruppe und der

scheinoperierten Gruppe. Dieses Ergebnis ist möglicherweise durch die geringe Anzahl von Tieren in der scheinoperierten Gruppe zu erklären.

4.2.3 Anti CD34 Antikörper

Die Immunhistochemie zum Nachweis des CD34 als Indikator für das Ausmaß an Neoangiogenese gilt als etablierte Methode [78]. In unseren Experimenten zeigte sich zwar ein Trend mit erhöhtem CD34 als Indikator für eine gesteigerte Gefäßneubildung in den Gehirnen der SAB/VEGF-Vektor Gruppe, dieser war jedoch gegenüber keiner der anderen Gruppen statistisch signifikant. Diese nur sehr diskrete Induktion ist möglicherweise auf die Applikationsform des VEGF Moleküls zurückzuführen. Durch die Injektion in den Beinmuskel der Tiere kommt es wohlmöglich nur zu einer verhältnismäßig gering ausgeprägten systemischen Wirkung. Die so hervorgerufenen lokalen Effekte im Bereich des ZNS waren dann wohlmöglich nicht ausgeprägt genug um statistisch signifikant zu werden.

4.2.4 Effizienz von intramuskulär applizierten VEGF-Plasmiden

Für die Untersuchung von therapeutischen Effekten verschiedener Substanzen im Tierversuch hat sich das tMCAO Tiermodell etabliert [66, 79]. Aus diesem Grund testeten wir unseren Ansatz einer Neuroprotektion durch Gentransfer mit VEGF Plasmiden zunächst in dem oben beschriebenen Vorversuch unter genau definierten Bedingungen im Bezug auf die Ischämie mit sicher zu erwartenden ischämischen Läsionen. Es ist bekannt, dass es durch derartige ischämische Läsionen zu einer Induktion der endogenen VEGF Expression kommt, allerdings in einem möglicherweise nicht hinreichendem Ausmaß, um das Hirngewebe effizient vor ischämischen Schäden zu schützen [80]. Unser Ansatz war also im Prinzip die endogene VEGF Produktion durch Applikation der Plasmide zu unterstützen. In diesem Vorexperiment wurde zunächst keine immunhistochemische Analyse der VEGF Expression und des Ausmaßes der Neoangiogenese durchgeführt.

Stattdessen konzentrierten wir uns auf die Größe der ischämischen Läsion an sich, wie sie in einer HE Färbung bestimmt werden kann. Dabei betrachteten wir die Größe der ischämischen Läsion als Zusammenfassung aller pathophysiologischen Vorgänge. Es konnte gezeigt werden, dass es in der mit VEGF Plasmiden behandelten Gruppe zu einer durchschnittlichen Reduktion der ischämischen Läsion um 43% kam. Basierend auf diesen Ergebnissen ist anzunehmen, dass VEGF einen neuroprotektiven Effekt im Schlaganfallmodell der Ratte zeigt. Die angesprochenen Probleme der Applikation mittels Gentransfer mit Plasmiden wie z.B. die kurze Halbwertszeit des Genproduktes und die schlechte Penetration des VEGF Moleküls durch die Blut-Hirn Schranke scheinen insgesamt weniger bedeutsam zu sein als in vorangegangenen Studien diskutiert wurde.

Diese von uns beschriebenen Effekte werden auf der anderen Seite erhärtet von Studien, die gezeigt haben, dass es bei der intravenösen Applikation von VEGF in einer hohen Dosierung zu einem Leck in der Blut-Hirn Schranke kommt, wodurch das Protein dann ins Hirngewebe penetrieren kann [81]. Kontrovers wurde die Reduktion einer Hirnödembildung durch VEGF durch Beeinträchtigung der Bluthirnschranke diskutiert [82]. Insgesamt muss man festhalten, dass die genauen Wirkungen des VEGF Moleküls auf die Vorgänge nach einer Ischämie bis auf die Neoangiogenese und die *mitogenen* Effekte (Steigerung der Zellteilungsrate) im Schlaganfallmodell weitestgehend unbekannt sind, v.a. im Bezug auf die pathophysiologischen Vorgänge nach einer stattgehabten SAB.

Im Bezug auf eine Neoangiogenese und anderweitige Effekte des VEGF Proteins lässt sich festhalten, dass eine systemische Applikation z.B. durch intramuskulären Gentransfer eine globale Wirkung auf das Gehirn entfalten kann. Dabei ist ein wesentlicher Vorteil gegenüber anderen Therapieansätzen, die mit lokaler Applikation (beispielsweise in der *Cisterna magna* platzierten Pellets) arbeiten, die einfachere und weniger invasive Darreichungsform. Ein weiterer Nachteil der lokalen Applikation ist die Limitierung der Ausbreitung im Parenchym durch Diffusionsprozesse, während über eine systemische

Applikation global im Hirnparenchym vergleichbare Konzentrationen erreicht werden können. Dies ist von besonderer Bedeutung bei dem SAB Modell, da die durch Vasospasmen bedingten Ischämien hier ebenfalls global über das gesamte Hirn verteilt auftreten können.

In der Phase der chronischen Ischämie nach SAB adaptiert das Hirngewebe sich an die Hypoxie durch Angiogenese und Dilatation der Mikrogefäße. Man geht allerdings davon aus, dass das Verhältnis zwischen vasokonstriktorisch wirkenden Substanzen (freies Hämoglobin, aktiviertes Endothelin-1 und freie Sauerstoffradikale) und vasodilatatorisch wirkenden Substanzen (NO) zugunsten der Vasokonstriktoren verschoben wird. In der vorliegenden Studie konnte ein Einfluss des applizierten VEGF Moleküls weder auf die Vasokonstriktoren, noch auf die Vasodilatoren nachgewiesen werden, da sich in der angiographischen Auswertung kein Unterschied bezüglich des Gefäßdurchmessers in den SAB Gruppen fand.

Auf der anderen Seite fand sich ein Trend hin zu weniger stark ausgeprägten ischämischen Läsionen in der VEGF Gruppe, wenn auch nicht statistisch signifikant. Außerdem zeigte sich in der histologischen Auswertung eine gesteigerte Mikroperfusion in der VEGF Gruppe trotz nachgewiesenen Vasospasmen. Diese gesteigerte Mikroperfusion wurde nochmals unterstrichen durch die gesteigerte Expression von CD34 als Hinweis auf eine gesteigerte Neoangiogenese, allerdings nicht mit ausreichender statistischer Signifikanz.

Vor diesem Hintergrund lässt sich festhalten, dass der durch die Neoangiogenese geförderte Neuroprotektion eine große Bedeutung zukommt. Die Hochregulierung von VEGF in der frühen Phase der zerebralen Ischämie oder sogar vor Entstehung eines Vasospasmus kann diese Neoangiogenese triggern. Dies bedeutet für das Gehirn eine frühzeitige Präkonditionierung für die später zu erwartende Ischämie und eine Aufrechterhaltung der Blutversorgung.

An dieser Stelle ist jedoch klar auf die Limitationen dieser Therapiemöglichkeit hinzuweisen. Ist das neuronale Gewebe einmal nekrotisch, so gilt es als

verloren. Interessanter für das therapeutische Potential ist das Gewebe, welches an die Nekroseareale angrenzt, die sog. *Penumbra*. Die Zellen der *Penumbra* befinden sich durch die Ischämie in einem Stadium zwischen Nekrose und vitalem Gewebe, sind somit regenerationsfähig und Ansatzpunkt für jede neuroprotektive Therapieform. Eine große Rolle spielen hier neben der reinen Unterversorgung der Zelle mit Stoffwechselfsubstraten v.a. apoptotische Signalkaskaden, also eine durch die Ischämie eingeleitetes Selbstmordprogramm. Erfolgreich appliziertes VEGF Protein könnte hier wie oben beschrieben an verschiedensten Punkten interferieren um die Zellen der *Penumbra* zu erhalten. Ziel der Applikation wäre also das Erhöhen der Überlebenschance ischämisch affizierte Neurone.

Eine weitere Einschränkung besteht bei einem länger andauernden hochgradigen Verschluss, so dass über längere Zeit jedes Substrat zur Unterhaltung des Stoffwechsels fehlt. Auch bei optimaler Beeinflussung der Signalkaskaden wäre ein Überleben der Neurone dadurch ausgeschlossen.

Auch die Applikationsform des VEGF Proteins ist ein bereits erläutertes Problem. Die Bereitstellung durch den körpereigenen Biosynthesemechanismus nach Vorlage des applizierten Plasmids stößt irgendwann an seine Grenzen, so dass gewisse Konzentrationen nicht überschritten werden können, zumal es zudem die Blut-Hirnschranke zu überwinden gilt.

5 Literaturverzeichnis

1. Xie, A., et al., *Novel mechanism of endothelin-1-induced vasospasm after subarachnoid hemorrhage*. J Cereb Blood Flow Metab, 2007, **27**(10): p. 1692-701.
2. Locatelli, M., *The importance of substance P and calcitonin gene related peptide as vasodilator neuropeptide during acute phase of experimental posthemorrhagic vasospasm*. J Neurosurg Sci, 2000, **44**(4): p. 186-91.
3. Sehba, F.A. and J.B. Bederson, *Nitric oxide in early brain injury after subarachnoid hemorrhage*. Acta Neurochir Suppl, 2011, **110**(Pt 1): p. 99-103.
4. Peterson, J.W., et al., *Immunological reaction against the aging human subarachnoid erythrocyte. A model for the onset of cerebral vasospasm after subarachnoid hemorrhage*. J Neurosurg, 1989, **71**(5 Pt 1): p. 718-26.
5. Vergouwen MD, Vermeulen M, Coert BA, Stroes ES, Roos YB. *Microthrombosis after aneurysmal subarachnoid hemorrhage: an additional explanation for delayed cerebral ischemia*. J Cereb Blood Flow Metab, 2008, **28**: p. 1761–1770
6. Greene, K.A., et al., *Impact of traumatic subarachnoid hemorrhage on outcome in nonpenetrating head injury. Part I: A proposed computerized tomography grading scale*. J Neurosurg, 1995, **83**(3): p. 445-52
7. van Gijn, J.a.G.J.R., *Subarachnoid haemorrhage: diagnosis, causes and management*. Brain, 2001, **124**(2): p. 249-78.
8. Okamoto, K., et al., *Family history and risk of subarachnoid hemorrhage: a case-control study in Nagoya, Japan*. Stroke, 2003, **34**(2): p. 422-6.
9. Feigin, V.L., et al., *Risk factors for subarachnoid hemorrhage: an updated systematic review of epidemiological studies*. Stroke, 2005, **36**(12): p. 2773-80.
10. Knekt, P., et al., *Risk factors for subarachnoid hemorrhage in a longitudinal population study*. J Clin Epidemiol, 1991, **44**(9): p. 933-9.
11. Inagawa, T., *Risk factors for aneurysmal subarachnoid hemorrhage in patients in Izumo City, Japan*. J Neurosurg, 2005, **102**(1): p. 60-7.
12. Anderson, C.S., et al., *Active and passive smoking and the risk of subarachnoid hemorrhage: an international population-based case-control study*. Stroke, 2004, **35**(3): p. 633-7.
13. Longstreth, W.T., et al., *Subarachnoid hemorrhage and hormonal factors in women. A population-based case-control study*. Ann Intern Med, 1994, **121**(3): p. 168-73.

14. Wityk, R.J., C. Zanferrari, and S. Oppenheimer, *Neurovascular complications of marfan syndrome: a retrospective, hospital-based study*. Stroke, 2002, **33**(3): p. 680-4.
15. Chhor, V., et al., *Admission risk factors for cerebral vasospasm in ruptured brain arteriovenous malformations: An observational study*. Crit Care, 2011, **15**(4): p. 190.
16. Salvarani, C., et al., *Primary central nervous system vasculitis presenting with intracranial hemorrhage*. Arthritis Rheum, 2011, **63**(11): p. 3598-606.
17. Kwak, J.H., et al., *Cerebral artery dissection: spectrum of clinical presentations related to angiographic findings*. Neurointervention, 2011, **6**(2): p. 78-83.
18. Memon, M.Y., et al., *Low grade glioma presenting as subarachnoid hemorrhage*. Neurosurgery, 1984, **14**(5): p. 574-7.
19. Guresir, E., et al., *Subarachnoid hemorrhage and intracerebral hematoma: incidence, prognostic factors, and outcome*. Neurosurgery, 2008, **63**(6): p. 1088-93.
20. Hop, J.W., et al., *Case-fatality rates and functional outcome after subarachnoid hemorrhage: a systematic review*. Stroke, 1997, **28**(3): p. 660-4.
21. Broderick, J.P., et al., *Initial and recurrent bleeding are the major causes of death following subarachnoid hemorrhage*. Stroke, 1994, **25**(7): p. 1342-7.
22. Findlay, J.M.a.G.M.D., *Causes of morbidity and mortality following intracranial aneurysm rupture*. Can J Neurol Sci, 1998, **25**(3): p. 209-15.
23. Kassell, N.F., et al., *Cerebral vasospasm following aneurysmal subarachnoid hemorrhage*. Stroke, 1985, **16**(4): p. 562-72.
24. Gorelick, P.B., et al., *Headache in acute cerebrovascular disease*. Neurology, 1986, **36**(11): p. 1445-50.
25. Polmear, A., *Sentinel headaches in aneurysmal subarachnoid haemorrhage: what is the true incidence? A systematic review*. Cephalalgia, 2003, **23**(10): p. 935-41.
26. Walter, S., *[Clinical evaluation of subarachnoid hemorrhaging]*. Radiologe, 2011, **51**(2): p. 97-9.
27. Charpentier, C., et al., *Multivariate analysis of predictors of cerebral vasospasm occurrence after aneurysmal subarachnoid hemorrhage*. Stroke, 1999, **30**(7): p. p. 1402-8.
28. Marbacher, S., J. Fandino, and A. Lukes, *Acute subdural hematoma from ruptured cerebral aneurysm*. Acta Neurochir (Wien), 2010, **152**(3): p. 501-7.

29. Zimmer, A. and W. Reith, [*Secondary complications of acute subarachnoid hemorrhage*]. *Radiologe*, 2011, **51**(2): p. 120-5.
30. Bruder, N., A. Rabinstein, and H. Participants in the International Multi-Disciplinary Consensus Conference on the Critical Care Management of Subarachnoid, *Cardiovascular and pulmonary complications of aneurysmal subarachnoid hemorrhage*. *Neurocrit Care*, 2011, **15**(2): p. 257-69.
31. Perry, J.J., et al., *Is the combination of negative computed tomography result and negative lumbar puncture result sufficient to rule out subarachnoid hemorrhage?* *Ann Emerg Med*, 2008, **51**(6): p. 707-13.
32. Fisher, C.M., J.P. Kistler, and J.M. Davis, *Relation of cerebral vasospasm to subarachnoid hemorrhage visualized by computerized tomographic scanning*. *Neurosurgery*, 1980, **6**(1): p. 1-9.
33. Hillman, J., *Should computed tomography scanning replace lumbar puncture in the diagnostic process in suspected subarachnoid hemorrhage?* *Surg Neurol*, 1986, **26**(6): p. 547-50.
34. Mitchell, P., et al., *Detection of subarachnoid haemorrhage with magnetic resonance imaging*. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 2001, **70**(2): p. 205-11.
35. Cecchini, A., et al., [*Subarachnoid hemorrhage caused by cerebral arteriovenous malformations. Importance of neuroradiological studies*]. *Minerva Med*, 1986, **77**(25): p. 1165-74.
36. Prestigiacomo, C.J., et al., *Three dimensional CT angiography versus digital subtraction angiography in the detection of intracranial aneurysms in subarachnoid hemorrhage*. *J Neurointerv Surg*, 2010, **2**(4): p. 385-9.
37. Lanzino, G. and P.I. D'Urso, *Modern management of aneurysmal subarachnoid hemorrhage*. *World Neurosurg*, 2011, **76**(5): p. 392-3.
38. Inagawa, T., et al., *Rebleeding of ruptured intracranial aneurysms in the acute stage*. *Surg Neurol*, 1987, **28**(2): p. 93-9.
39. J Mocco, L. Nelson Hopkins, *International Subarachnoid Aneurysm Trial analysis*, *Journal of Neurosurgery*, 2008, **108**(3): p. 436-436
40. Suarez JI, T.R., Selman WR, *Aneurysmal subarachnoid hemorrhage*. *N Engl J Med*, 2006, **354**: p. 387-396.
41. Treggiari MM, W.B., Suter PM, Romand JA, *Systematic review of the prevention of delayed ischemic neurological deficits with hypertension, hyper- volemia, and hemodilution therapy following subarachnoid hemorrhage*. *J Neurosurg*, 2003, **98**: p. 978-984.
42. Weyer GW, N.C., Macdonald RL, *Evidence-based cerebral vasospasm management*. *Neurosurg Focus*, 2006, **21**: p. 8.

43. Hop JW, R.G., Algra A, van Gijn J, *Case-fatality rates and functional outcome after subarachnoid hemorrhage: A systematic review*. Stroke, 1997, **28**: p. 660-664.
44. Hanggi, D., et al., *A multimodal concept in patients after severe aneurysmal subarachnoid hemorrhage: results of a controlled single centre prospective randomized multimodal phase I/II trial on cerebral vasospasm*. Cen Eur Neurosurg, 2009, **70**(2): p. 61-7.
45. Laskowitz, D.T. and B.J. Kolls, *Neuroprotection in subarachnoid hemorrhage*. Stroke, 2010, **41**(10): p. 79-84.
46. Taccone, F.S., *Vasodilation and neuroprotection: the magnesium saga in subarachnoid hemorrhage*. Crit Care Med, 2010, **38**(5): p. 1382-4.
47. Cao, L., et al., *VEGF links hippocampal activity with neurogenesis, learning and memory*. Nat Genet, 2004, **36**(8): p. 827-35.
48. Velat, G.J., et al., *Vasospasm after aneurysmal subarachnoid hemorrhage: review of randomized controlled trials and meta-analyses in the literature*. World Neurosurg, 2011, **76**(5): p. 446-54.
49. Wlazlo, A.P. and H.C. Ertl, *DNA tumor vaccines*. Arch Immunol Ther Exp (Warsz), 2001, **49**(1): p. 1-11.
50. Byun, J., et al., *Efficient expression of the vascular endothelial growth factor gene in vitro and in vivo, using an adeno-associated virus vector*. J Mol Cell Cardiol, 2001, **33**(2): p. 295-305.
51. Kajdaniuk, D., et al., *Vascular endothelial growth factor (VEGF) - part 1: in physiology and pathophysiology*. Endokrynol Pol, 2011, **62**(5): p. 444-55.
52. Heil, M., et al., *Vascular endothelial growth factor (VEGF) stimulates monocyte migration through endothelial monolayers via increased integrin expression*. Eur J Cell Biol, 2000, **79**(11): p. 850-7.
53. Feng Y, R.P., Bhatt AJ, *Neuroprotective effects of vascular endothelial growth factor following hypoxic ischemic brain injury in neonatal rats*. Bioessays, 2008, **26**: p. 135-137.
54. Storkebaum, E., D. Lambrechts, and P. Carmeliet, *VEGF: once regarded as a specific angiogenic factor, now implicated in neuroprotection*. Bioessays, 2004, **26**(9): p. 943-54.
55. Vezzani, A., *VEGF as a target for neuroprotection*. Epilepsy Curr, 2008, **8**(5): p. 135-7.
56. Krupinski, J., et al., *Role of angiogenesis in patients with cerebral ischemic stroke*. Stroke, 1994, **25**(9): p. 1794-8.
57. Wang, Y., et al., *VEGF-overexpressing transgenic mice show enhanced post-ischemic neurogenesis and neuromigration*. J Neurosci Res, 2007, **85**(4): p. 740-7.

58. Wick, A., et al., *Neuroprotection by hypoxic preconditioning requires sequential activation of vascular endothelial growth factor receptor and Akt*. J Neurosci, 2002, **22**(15): p. 6401-7.
59. Croll, S.D.W., S. J., *Vascular growth factors in cerebral ischemia*. Mol. Neurobiology, 2001, **23**: p. 121-35.
60. Manoonkitiwongsa, P.S.S., R. L.; McCreer, D. B.; Whitter, E. F.; Lyden, P. D. , *Neuroprotection of ischemic brain by vascular endothelial growth factor is critically dependent on proper dosage and may be compromised by angiogenesis*. J. Cereb. Blood Flow Metab., 2004, **24**(6): p. 693-702.
61. Zhu, W.M., Y.; Zhao, L. F.; Wang, Y.; Zhu, J. H.; Zhu, Y.; Yang, G. Y., *Transplantation of vascular endothelial growth factor-transfected neural stem cells into the rat brain provides neuroprotection after transient focal cerebral ischemia*. Neurosurgery, 2005, **57**(2): p. 325-33.
62. Emerich, D.F., et al., *Injectable VEGF hydrogels produce near complete neurological and anatomical protection following cerebral ischemia in rats*. Cell Transplant, 2010, **19**(9): p. 1063-71.
63. Zhu, W., Y. Mao, and L.F. Zhou, *Reduction of neural and vascular damage by transplantation of VEGF-secreting neural stem cells after cerebral ischemia*. Acta Neurochir Suppl, 2005, **95**: p. 393-7.
64. Zheng, X.R., et al., *[Adenovirus-mediated vascular endothelial growth factor165 gene therapy in treatment of hypoxic-ischemic brain damage: experiment with rats]*. Zhonghua Yi Xue Za Zhi, 2009, **89**(2): p. 128-32.
65. Forstreuter, F., et al., *Vascular endothelial growth factor induces chemotaxis and proliferation of microglial cells*. Journal of Neuroimmunology, 2002, **132**(1); p. 93-98.
66. Koizumi, J., Yoshida, Y., Nakazawa, T., Ooneda, G, *Experimental studies of ischemic brain edema, I: a new experimental model of cerebral embolism in rats in which recirculation can be introduced in the ischemic area*. Jpn. J. Stroke, **1986**(8): p. 1-8.
67. Prunell, G.F., T. Mathiesen, and N.A. Svendgaard, *Experimental subarachnoid hemorrhage: cerebral blood flow and brain metabolism during the acute phase in three different models in the rat*. Neurosurgery, 2004, **54**(2): p. 426-36.
68. Turowski, B., et al., *New angiographic measurement tool for analysis of small cerebral vessels: application to a subarachnoid haemorrhage model in the rat*. Neuroradiology, 2007, **49**(2): p. 129-37.
69. 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, 1995, **26**: p. 1086-1092.
70. Alkan, T, Korfali, E.: *Experimental subarachnoid hemorrhage models in rats*. Acta Neurochir., 2002, **83**: p. 61-69.

71. Verlooy, J., et al., *The course of vasospasm following subarachnoid haemorrhage in rats. A vertebrobasilar angiographic study.* Acta Neurochir (Wien), 1992, **117**(1-2): p. 48-52.
72. Aladag, M.A., et al., *The attenuation of vasospasm by using a sod mimetic after experimental subarachnoidal haemorrhage in rats.* Acta Neurochir (Wien), 2003, **145**(8): p. 673-7.
73. Konczalla, J., et al., *Alteration of the cerebrovascular function of endothelin B receptor after subarachnoidal hemorrhage in the rat.* Exp Biol Med (Maywood), 2006, **231**(6): p. 1064-8.
74. Longo, M., et al., *Cerebral angiography in the rat with mammographic equipment: a simple, cost-effective method for assessing vasospasm in experimental subarachnoid haemorrhage.* Neuroradiology, 2002, **44**(8): p. 689-94.
75. Delgado, T.J., J. Brismar, and N.A. Svendgaard, *Subarachnoid haemorrhage in the rat: angiography and fluorescence microscopy of the major cerebral arteries.* Stroke, 1985, **16**(4): p. 595-602.
76. Boullin, D.J., et al., *The calibre of cerebral arteries of the rat studied by carotid angiography: a model system for studying the aetiology of human cerebral arterial constriction after aneurysmal rupture.* Neuroradiology, 1981, **21**(5): p. 245-52.
77. Megyesi, J.F. and J.M. Findlay, *In vivo animal models of cerebral vasospasm: a review.* Acta Neurochir Suppl, 2001, **77**: p. 99-102.
78. Guo X, L.L., Zhang M, Bergeron A, Cui Z, Dong JF, Zhang J, *Correlation of CD34+ cells with tissue angiogenesis after traumatic brain injury in a rat model.* J Neurotrauma, 2009, **26**: p. 1337-44.
79. Brecht, S., et al., *Changes in peptidyl-prolyl cis/trans isomerase activity and FK506 binding protein expression following neuroprotection by FK506 in the ischemic rat brain.* Neuroscience, 2003, **120**(4): p. 1037-48.
80. Krum, J.M., N. Mani, and J.M. Rosenstein, *Roles of the endogenous VEGF receptors flt-1 and flk-1 in astroglial and vascular remodeling after brain injury.* Exp Neurol, 2008, **212**(1): p. 108-17.
81. Zhang, L., et al., *VEGF is essential for the growth and migration of human hepatocellular carcinoma cells.* Mol Biol Rep, 2011, **12**: p. 1-9.
82. Harrigan, M.R., *Angiogenic factors in the central nervous system.* Neurosurgery, 2003. **53**(3): p. 639-60.

6 Anhang

Danksagung

An erster Stelle möchte ich meiner Familie danken, ohne deren Unterstützung ich weder mein Studium noch diese Promotionsarbeit hätte realisieren können. Ein kurzer Dank für die Begleitung auf dem langen Weg zum Dokortitel.

Besonderer Dank gilt vor allem meinem Doktorvater Prof. Dr. med Daniel Hänggi sowie dem Direktor der Klinik für Neurochirurgie an der Universitätsklinik Düsseldorf, Prof. Dr. med. Hans-Jakob Steiger für die Bereitstellung des Themas und die fantastische Betreuung.

Vor allem möchte ich an dieser Stelle meinem Betreuer Dr. med. Sven Eicker danken, der stets ein offenes Ohr für meine Probleme hatte. Einen besseren Begleiter hätte ich mir auf dem beschwerlichen Weg zur Promotion nicht vorstellen können.

Ein großes Dankeschön auch an das Team der Neuroradiologie der Uniklinik Düsseldorf, vor allem an PD Dr. med. Bernd Turowski und Dr. med. Stephan Macht, ohne die die angiographische Auswertung nicht möglich gewesen wäre.

Danke auch an das Team der Neuropathologie an der Uniklinik Düsseldorf für die tolle Unterstützung. Ein besonderer Dank richtet sich an Frau Brigitte Senger (Labor der Neurochirurgie) für die geduldige Anleitung und die nette Einführung in die Laborarbeit.

Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere an Eides statt, dass die Dissertation selbstständig und ohne unzulässige fremde Hilfe erstellt worden ist und die hier vorgelegte Dissertation nicht von einer anderen Medizinischen Fakultät abgelehnt worden ist.

Düsseldorf, den 30.05.2014

Moritz Hoppe