



Aus der Neurochirurgischen Klinik und Poliklinik des Klinikums rechts  
der Isar der Technischen Universität München

Direktor: Prof. Dr. Bernhard Meyer

# Evaluierung funktioneller optoakustischer Bildgebung der fokalen zerebralen Ischämie und der Subarachnoidalblutung im experimentellen Mausmodell

Sebastian Josef Hambauer

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München zur  
Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Medizin genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Prof. Dr. Ernst J. Rummeny

Prüfer der Dissertation: 1. Priv.-Doz. Dr. Jens Lehmborg  
2. Prof. Dr. Claus Zimmer

Die Dissertation wurde am 07.10.2015 bei der Technischen Universität München eingereicht und  
durch die Fakultät für Medizin am 14.12.2016 angenommen.

## Abkürzungsverzeichnis

ADC	= apparent diffusion coefficient = scheinbarer Diffusionskoeffizient
$C_{Hb}$	= Hämoglobinkonzentration
CBF	= cerebral blood flow = zerebraler Blutfluss
CBV	= cerebral blood volume = zerebrales Blutvolumen
CMRO <sub>2</sub>	= cerebral metabolic rate of oxygen = Sauerstoff-Metabolisierungsrate des Gehirns
CPP	= cerebral perfusion pressure = zerebraler Perfusionsdruck
CSD	= cortical spreading depolarization = sich kortikal ausbreitende Depolarisation
CT	= Computertomographie
CTA	= CT-Angiographie
DSA	= digitale Subtraktionsangiographie
DIND	= delayed ischemic neurologic deficit = verzögertes ischämisches neurologisches Defizit
DWI	= diffusion weighted imaging = diffusions-gewichtete Bildgebung
ET-1	= Endothelin-1
g	= Gramm
GCS	= Glasgow Coma Scale = Glasgow-Koma-Skala
h	= Stunden
HBOC	= hemoglobin based oxygen carriers = hämoglobin-basierte artifizielle Sauerstoffträger
HE-Färbung	= Hämatoxylin-Eosin-Färbung
IBMI	= Institute for Biological and Medical Imaging = Institut für biologische und medizinische Bildgebung
ICG	= Indocyanidgrün
ICP	= intracranial pressure = intrakranieller Druck
i.p.	= intraperitoneal
i.v.	= intravenös
IVM	= Intravital-Mikroskopie
kg	= Kilogramm
KG	= Körpergewicht
MAP	= mean arterial pressure = mittlerer arterieller Blutdruck
MCAO	= middle cerebral artery occlusion = A. cerebri media-Verschluss
ml	= Milliliter
$\mu$ l	= Mikroliter
mmHg	= Millimeter Quecksilbersäule

mmol	= Millimol
MRT	= Magnetresonanztomographie
MSOT	= Multi Spectral Optoacoustic Tomography
NaCl	= Natriumchlorid = Kochsalz
nm	= Nanometer
OEF	= oxygen extraction fraction = Sauerstoffverbrauchsrate
OPS	= orthogonal polarization spectral = orthogonale Polarisations-Spektroskopie
PET	= Positronen-Emissions-Tomographie
PFC	= Perfluorocarbon
PWI	= perfusion weighted imaging = perfusions-gewichtete Bildgebung
ROI	= region of interest = näher spezifizierter Bildausschnitt
ROS	= reactive oxygen species = chemisch reaktive Sauerstoffmetaboliten
SAB	= Subarachnoidalblutung
SaO <sub>2</sub>	= arterieller Sauerstoffgehalt
SPECT	= single photon emission computed tomography = Einzelphotonen-Emissions- Computertomographie
SIRS	= systemic inflammatory response syndrome = systemische Entzündungsreaktion
TCD	= transcranial Doppler ultrasound = transkranielle Doppler-Sonographie
TPR	= total peripheral resistance = systemischer Gefäßwiderstand

# Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis .....	2
1 Einleitung .....	6
1.1 Klinischer Überblick über die Subarachnoidalblutung .....	7
1.2 Early Brain Injury .....	9
1.2.1 Akuter Druckanstieg .....	9
1.2.2 Zerebraler Blutfluss und gestörte Autoregulation .....	10
1.2.3 Oxidativer Stress und Inflammation .....	11
1.3 Cortical Spreading Depression .....	11
1.4 Thrombembolische Ereignisse .....	12
1.5 Zerebraler Vasospasmus .....	13
1.6 Das Penumbra-Konzept .....	15
1.7 Bildgebung im experimentellen Schlaganfallmodell .....	17
1.7.1 Allgemeiner Überblick über tierexperimentelle bildgebende Verfahren .....	17
1.7.2 Grundlagen der „Multi Spectral Optoacoustic Tomography (MSOT)“ .....	17
1.7.3 Bildgebungsstudien zur frühen Pathophysiologie nach Subarachnoidalblutung .....	20
1.8. Artifizielle Sauerstoffträger bei neurologischen Krankheitsbildern .....	21
1.8.1 Arten künstlicher O <sub>2</sub> -Transport-Komponenten .....	21
1.8.2 Charakterisierung von Perfluorocarbonen .....	22
1.8.3 Perfluorocarbone zur Sekundärprophylaxe der zerebralen Ischämie .....	22
1.9 Hypothesen dieser Arbeit .....	23
2 Material und Methoden .....	25
2.1 Versuchstiere .....	25
2.2 Narkose .....	25
2.3 Temperaturkontrolle .....	26
2.4 Körpergewicht .....	27
2.5 Induktion der Ischämie im MCAO-Modell .....	27
2.6 Das endoluminale Perforationsmodell der Subarachnoidalblutung .....	28
2.7 Aufbau der „Multi Spectral Optoacoustic Tomography“ .....	30
2.7.1 Messungen im Modell des ischämischen Schlaganfalls .....	31
2.7.2 Messungen im endoluminalen Perforationsmodell der Subarachnoidalblutung .....	31
2.8 Bildrekonstruktion .....	32
2.9 Histologische Auswertung .....	34
2.10 Applikation von Oxycyte <sup>®</sup> nach Subarachnoidalblutung .....	34
2.11 Neurologische Testung nach Subarachnoidalblutung .....	36

2.12 Hirnwassergehaltmessung nach Oxycyte <sup>®</sup> -Applikation .....	37
2.13 Statistische Auswertung .....	37
3 Ergebnisse.....	39
3.1 MSOT-Bildgebung: Ischämischer Schlaganfall.....	39
3.1.1 Morphologische Bildgebung im MCAO-Modell.....	39
3.1.2 Funktionelle Bildgebung im MCAO-Modell.....	41
3.2 MSOT-Bildgebung: Subarachnoidalblutung .....	45
3.2.1 Morphologische Bildgebung bei der Subarachnoidalblutung.....	45
3.2.2 Funktionelle Bildgebung bei der Subarachnoidalblutung .....	46
3.3 Therapiestudie mit Oxycyte <sup>®</sup> .....	48
3.3.1 Intrakranielle Druckverteilung.....	48
3.3.2 Mortalitätsrate .....	48
3.3.3 Hirnwassergehalt.....	50
3.3.4 Neurologische Testung.....	51
4 Diskussion .....	52
4.1 Methoden.....	52
4.1.1 Auswahl der Versuchstiere.....	52
4.1.2 Wahl der Narkose.....	52
4.1.3 Das Middle-cerebral-artery-occlusion (MCAO)-Modell .....	53
4.1.4 Das endoluminale Perforationsmodell der Subarachnoidalblutung.....	54
4.2 Ergebnisse.....	55
4.2.1 Bedeutung der „Penumbra“ für die Pathophysiologie des ischämischen Schlaganfalls.....	55
4.2.2 Grundlagen der Diagnostik mit der „Multi Spectral Optoacoustic Tomography“ .....	56
4.2.3 Ischämiediagnostik im MSOT .....	57
4.2.4 Funktionelle Aspekte der Ischämiebildung mit dem MSOT .....	58
4.2.5 Methodische Evaluation des MSOTs bei der Subarachnoidalblutung .....	59
4.2.6 Perspektiven der optoakustischen Bildgebung.....	61
4.2.7 Applikation von Perfluorocarbonen nach Subarachnoidalblutung .....	62
5 Zusammenfassung.....	66
Literaturverzeichnis.....	68
Abbildungsverzeichnis.....	83
Danksagung .....	84

## 1 Einleitung

Die zerebrovaskulären Ereignisse, die in westlichen Nationen in der Todesursachenstatistik nach Herz-Kreislauf-Erkrankungen und Malignomen an dritter Stelle liegen, stellen eine große Herausforderung in der modernen Medizin dar. Nicht nur, weil sie Leben kosten, sondern auch, weil viele Betroffene diese Erkrankungen oft nur mit gravierenden bleibenden Behinderungen überleben und lebenslang gepflegt werden müssen.

Daher wurden in den letzten Jahren umfangreiche Anstrengungen unternommen, um die Ursachen und den Verlauf der - klinisch Schlaganfall oder Stroke genannten - zerebrovaskulären Ereignisse besser zu verstehen und dementsprechend neue therapeutische Ansätze finden zu können.

Grundsätzlich unterscheidet man beim Schlaganfall zwischen ischämischen und hämorrhagischen Formen. Mit über 80% ist die ischämische Läsion die häufigere Form, aber die hämorrhagischen Varianten sind - wegen der eingeschränkten therapeutischen Optionen und der häufigen Sekundärkomplikationen - nicht weniger relevant. Eine Untergruppe des hämorrhagischen Schlaganfalls stellt die Subarachnoidalblutung (SAB) dar, die zwar nur für 5% aller zerebrovaskulären Ereignisse verantwortlich ist, aber aufgrund des relativ jungen Alters der Betroffenen von im Durchschnitt 55 Jahren einen hohen volkswirtschaftlichen Schaden nach sich zieht.

Die Pathophysiologie dieser Erkrankungen und deren Bedeutung für den klinischen Verlauf ist nicht vollständig verstanden, weswegen weitere Forschung auf diesem Gebiet unerlässlich ist. Im Sinne einer personalisierten Medizin kommt den bildgebenden Verfahren dabei eine entscheidende Rolle zu, da sie neben der Diagnostik der Erkrankung auch eine Verlaufskontrolle des Patienten erlauben. Vor allem nicht-invasive funktionelle Bildgebungsmodalitäten wie die Magnetresonanztomographie (MRT) oder die Positronen-Emissionstomographie (PET) stehen im Zentrum dieses Interesses. Durch die genaue Kenntnis der individuellen Pathophysiologie lassen sich Rückschlüsse auf zugrundeliegende Ursachen ziehen und es ist zu erwarten, dass die Patienten dadurch besser als bisher kausal therapiert werden können.

Allerdings müssen neue, multimodale Verfahren zunächst präklinisch weiterentwickelt und optimiert werden, um die gewünschten Informationen über metabolische, inflammatorische und degenerative Prozesse zeitgleich im Krankheitsverlauf darstellen zu können. Wegen der geringen Körpergröße ist es im Tierexperiment neben der Verwendung von PET und MRT auch möglich, mittels optischer Methoden nicht-invasive Bildgebung tieferer Hirnareale durchführen zu können. Durch die Detektion von Absorptions- und Fluoreszenzvorgängen erlauben sie die morphologische und funktionelle Charakterisierung des Gehirns, allerdings mit im Vergleich zu MRT oder PET geringerem technischem Aufwand und ohne Strahlenbelastung.

Daher ist es Ziel dieser Arbeit, die „Multi Spectral Optoacoustic Tomography“ (MSOT) im Mausmodell des ischämischen Schlaganfalls anzuwenden, um deren Validität im Sinne einer Hypoxie-Bildgebung

zu überprüfen, und im nächsten Schritt für das Modell der SAB zu etablieren. Für die SAB wurde insbesondere überprüft, ob sich im Mausmodell mittels MSOT das Blutungsausmaß bestimmen lässt, und ob eine Hypoperfusion oder Hypoxie im Parenchym darstellbar ist. Als Ergänzung dazu wurde eine Pilotstudie zur Verbesserung des O<sub>2</sub>-Angebotes nach SAB mittels artifizieller Sauerstoffträger - als mögliche Therapieoption einer früh auftretenden Hypoxie - durchgeführt.

## **1.1 Klinischer Überblick über die Subarachnoidalblutung**

Bei der atraumatischen SAB handelt es sich um eine arterielle Blutung zumeist aus einem Gefäß der Schädelbasis. Dabei dringt Blut, in 85% von einem rupturierten Aneurysma gespeist (van Gijn, Kerr et al. 2007), unter hohem Druck in den Raum zwischen dem Gehirn und der Schädelkalotte ein, was lebensbedrohliche Ausmaße annehmen kann. Daher versterben 12% aller Betroffenen noch vor Einlieferung in ein Krankenhaus (Broderick, Brott et al. 1994). Die akute Blutung hat initial und im Verlauf weitreichende Konsequenzen, so dass über die Hälfte der Betroffenen an der SAB und ihren Folgen verstirbt (Hop, Rinkel et al. 1997) und die Hälfte aller Überlebenden wiederum mit anhaltenden neurologischen und kognitiven Defiziten zurück bleiben. Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass, obwohl die SAB mit einer Inzidenz von 9,1/100000/Jahr (de Rooij, Linn et al. 2007) nur für ca. 5% aller Schlaganfälle verantwortlich ist, sie doch von der gesundheitspolitischen und ökonomischen Relevanz her gleichauf mit dem ischämischen Schlaganfall und der Intrazerebralblutung zu setzen ist. Dazu kommt, dass das mittlere Erkrankungsalter mit 55 Jahren eine verhältnismäßig junge Patientengruppe betrifft, weswegen 27% aller durch einen Schlaganfall verlorenen potentiellen Lebensjahre auf die SAB entfallen, obwohl nur 5% aller schlaganfallbedingter Todesfälle durch eine SAB zustande kommen (Johnston, Selvin et al. 1998).

Klinisch präsentiert sich die SAB in 97% aller Fälle durch schlagartig einsetzende Kopfschmerzen, oft zusammen mit Übelkeit und Erbrechen, Meningismus und einem Bewusstseinsverlust, der aufgrund der dahinter vermuteten rascheren Druckerhöhung mit einem schlechteren Gesamtüberleben vergesellschaftet ist (Hijdra, van Gijn et al. 1988). Basierend darauf wurden verschiedene klinische Klassifikationen entwickelt, um die Schwere der SAB zu beurteilen. Am weitesten verbreitet ist die Einteilung nach Hunt & Hess (Hunt and Hess 1968), die die neurologische Verfassung des Patienten bei Einlieferung betrachtet, sowie die WFNS- Klassifikation (Teasdale, Drake et al. 1988), die neben der in der Intensivmedizin weit verbreiteten Glasgow Coma Scale (GCS) zur Beurteilung des Bewusstseinszustandes auch motorische Defizite mit berücksichtigt (siehe Tabelle 1).

**Tabelle 1: Klinische Klassifikationssysteme der Subarachnoidalblutung (mod. nach Friedrich, Dissertation, 2010)**

	WFNS	Hunt & Hess
<b>Grad</b>	GCS	Kriterien
<b>I</b>	15; kein motorisches Defizit	Asymptomatisch, leichte Kopfschmerzen, leichte Nackensteifigkeit
<b>II</b>	13-14; kein motorisches Defizit	Starke Kopfschmerzen, steifer Nacken, keine neurologischen Auffälligkeiten, außer Hirnnervenausfällen
<b>III</b>	13-14; motorisches Defizit	Somnolenz, Verwirrtheit, geringes fokalneurologisches Defizit
<b>IV</b>	7-12	Sopor, mäßige oder schwere Hemiparese
<b>V</b>	3-6	Koma, Einklemmungszeichen

Diagnostiziert wird die SAB heutzutage immer auf Basis einer kranialen Computertomographie (CT), die neben der Entscheidung, ob es sich um eine SAB handelt, auch die Beurteilung des Ausmaßes der Blutungsmenge erlaubt, was wiederum Auswirkungen auf die Prognose hat. Die Sensitivität der CT ist mit 92% zwar gut, eine Liquorpunktion ist bei klinischem Verdacht jedoch unerlässlich (van der Wee, Rinkel et al. 1995), weil auch eine SAB mit unauffälligem CT vorkommen kann, vor allem, wenn die Blutung klein war oder zeitlich weiter zurück liegt.

In Kombination mit einer adäquaten Bildgebung ermöglicht eine Liquorpunktion und ihre sukzessive Aufarbeitung in einer Spektrophotometrie - unter Berücksichtigung einer diagnostischen Lücke von 12 Stunden - die Detektion nahezu aller rupturierten Aneurysmen. Als Goldstandard zur Lokalisation dieser Aneurysmen gilt die digitale Subtraktionsangiographie (DSA) mit Kontrastmittelgabe, da sie, im Gegensatz zur CT-Angiographie (CTA) und der MR-Angiographie (MRA), deren Auflösung nicht an die der DSA heranreicht, auch die Detektion von Aneurysmen < 5mm erlaubt. Da es sich bei der DSA jedoch um ein – mit Blutungsrisiken verbundenes - invasives Verfahren handelt, haben aufgrund der Fortschritte in der Technik und der leichteren Handhabung die nicht-invasiven und somit sicheren Methoden der CTA und MRA im klinischen Alltag Einzug gefunden. Sie werden mittlerweile auch in der Breite alternativ zur DSA eingesetzt und erzielen dabei gute Resultate (Chappell, Moure et al. 2003, Li, Cheng et al. 2009).

Nach der Identifikation des auslösenden Aneurysmas ist ein frühzeitiger Verschluss desselbigen anzustreben, um das Risiko einer erneuten Blutung, die mit einer hohen Mortalität vergesellschaftet ist, zu minimieren. Hierbei gibt es zwei Möglichkeiten: Entweder kann das Aneurysma chirurgisch,

das heißt durch das Abklemmen des Aneurysmas von der zuführenden Arterie, saniert werden oder durch die endovaskuläre Okklusion des Aneurysmas durch Platinspiralen, deren thrombogene Eigenschaften das Aneurysma verschließen. Beide Methoden sind sicher in ihrer Anwendung, unterscheiden sich aber nach neueren Erkenntnissen in klinischen Endpunkten (Molyneux, Kerr et al. 2005). Eine Therapieentscheidung sollte deswegen individuell, basierend sowohl auf der Morphologie und Lokalisation des Aneurysmas als auch auf dem Zustand des Patienten getroffen werden.

Obwohl mit dem Verschluss des Aneurysmas der offensichtlichste Risikofaktor für einen ungünstigen klinischen Verlauf zuverlässig beseitigt werden kann, sterben dennoch über 50% der Betroffenen an der SAB. Ebenso bleiben bei einem Großteil der Überlebenden schwerwiegende neurologische und kognitive Defizite bestehen. Daher stellt sich die Frage, welche Mechanismen den weiteren Verlauf nach dem Aneurysma-Verschluss bestimmen. Einerseits sind hier die direkten Auswirkungen der initialen Blutung zu nennen (= early brain injury), weswegen sich zwei Drittel aller Todesfälle binnen der ersten zwei Tage ereignen (Roos, de Haan et al. 2000). Andererseits treten schwere neurologische (Janjua and Mayer 2003, Vergouwen, Etminan et al. 2011) und systemische Komplikationen auf (Stevens and Nyquist 2007), die den klinischen Verlauf und die Prognose entscheidend beeinflussen. Daher wende ich mich im Folgenden dem aktuellen Stand der Forschung zur Pathophysiologie hinter diesen Ereignissen zu.

## 1.2 Early Brain Injury

Einen wichtigen Beitrag zur Pathophysiologie der SAB leisten Mechanismen, die unmittelbar nach der Blutung in Gang gesetzt werden. Zusammengefasst unter dem Begriff des „Early Brain Injury“ tragen sie, wie neuere Erkenntnisse gezeigt haben (Macdonald, Pluta et al. 2007, Sehba, Hou et al. 2012), signifikant zum Schadensprofil der SAB bei. Exemplarisch werden die wichtigsten, auf tierexperimentellen und klinischen Daten, beruhenden Informationen dargestellt.

### 1.2.1 Akuter Druckerhöhung

Zu Beginn kommt es bei der SAB zu einem akuten Anstieg des intrakraniellen Drucks (intracranial pressure, ICP), der beim gesunden Menschen physiologisch 0 bis 5 mmHg beträgt. Wie in Tierexperimenten beobachtet, steigt er bei der SAB bis auf diastolische Blutdruckwerte an (Voldby 1988), was aufgrund der direkten Auswirkung auf den zerebralen Perfusionsdruck (cerebral perfusion pressure, CPP) die Durchblutung im Gehirn schwer beeinträchtigen kann. Denn der CPP bemisst sich nach folgender Formel

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

wobei MAP für den mittleren arteriellen Blutdruck steht. Zwar konnte im Tiermodell kein Perfusionsarrest beobachtet werden (Dorsch, Branston et al. 1989), aber die - aufgrund der

Einbettung in den knöchernen Schädel - resultierende globale Ischämie hat weitreichende Konsequenzen. Einerseits kann der Masseneffekt durch die Blutung und die Entwicklung eines akuten Hydrocephalus zur plötzlichen Einklemmung und somit zum Tode führen, weswegen die Schwere der SAB auch mit dem ICP-Spitzendruck korreliert (Heuer, Smith et al. 2004), andererseits induziert der hohe Hirndruck Veränderungen im zerebralen Blutfluss und Stoffwechsel (Losiniecki and Zuccarello 2008, Schubert and Thome 2008). Gleichzeitig kommt es durch den Druck zur Entwicklung eines zytotoxischen Hirnödems, das durch eine Störung der Blut-Hirn-Schranke und die daraus resultierende erhöhte Permeabilität den Druckschaden noch weiter verstärkt (Helbok, Ko et al. 2011).

### 1.2.2 Zerebraler Blutfluss und gestörte Autoregulation

Bedingt durch den Abfall des CPPs, der mit dem zerebralen Blutfluss (cerebral blood flow, CBF) und dem systemischen Gefäßwiderstand (total peripheral resistance, TPR) nach der Formel

$$\text{CBF} = \text{CPP} / \text{TPR}$$

zusammenhängt, kommt es zu einem drastischen Rückgang des CBF, und damit auch der Sicherstellung der Nährstoffversorgung des Gehirns. Durch Umverteilung des Blutes im Subarachnoidalraum und dem damit verbundenen Absinken des ICP sollte es binnen kurzer Zeit zur Wiederherstellung der Durchblutung kommen. Allerdings sind länger anhaltende CBF-Reduktionen von 35% bis 85% gegenüber Kontrollprobanden bei wieder normalisiertem CPP sowohl im Tiermodell (Bederson, Levy et al. 1998) als auch im Menschen (Jakobsen, Overgaard et al. 1990, Schubert, Seiz et al. 2009) nachgewiesen worden. Eine inverse Korrelation zwischen Dauer und Ausmaß dieser Minderperfusion und der Prognose nach SAB bei Patienten wurde ebenfalls gefunden (Geraud, Tremoulet et al. 1984).

Die Gründe für diesen Sachverhalt sind noch immer nicht ganz klar, allerdings gibt es mehrere Hinweise auf eine Beteiligung von Oxyhämoglobin, freigesetzt aus zerfallenden Erythrozyten, die Bildung freier Radikale (Gaetani, Rodriguez y Baena et al. 1994), die Erhöhung exzitatorischer Neurotransmitter wie Glutamat, sowie eine erniedrigte Konzentration an Stickstoffmonoxid (nitric oxide, NO) (Sehba, Schwartz et al. 2000), einem der wichtigsten Vasodilatoren im Säugerhirn.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Autoregulation im Gehirn im Tiermodell bereits unmittelbar nach der Blutung stark beeinträchtigt ist (Rasmussen, Hauerberg et al. 1992). Beim Menschen ist dieser Aspekt vor allem in den ersten 72 h nach SAB prominent (Schmieder, Moller et al. 2006). Die Aufrechterhaltung dieses Mechanismus scheint auch Einfluss auf die Entwicklung neurologischer Spätschäden, wie der delayed ischemic neurologic deficits (DIND) (Ratsep and Asser 2001), als auch des Vasospasmus zu haben.

### 1.2.3 Oxidativer Stress und Inflammation

Wie bereits oben angesprochen wird durch den Austritt von Blut in den Subarachnoidalraum und die daraus resultierende Freisetzung großer Mengen an Hämoglobin, das oxidierende Eigenschaften besitzt, die Bildung reaktiver O<sub>2</sub>-Spezies (ROS) gefördert (Ayer and Zhang 2008). Diese chemischen Verbindungen beeinflussen in vielfältiger Weise zelluläre Prozesse. Exemplarisch herausgestellt seien die direkte Beschädigung von Membranstrukturen, die Induktion starker Spasmogene, die Einleitung pro-apoptotischer Signalwege, sowie eine Permeabilitätserhöhung der Blut-Hirn-Schranke.

Das begünstigt die Ausbildung ausgedehnter Entzündungsprozesse (Dumont, Dumont et al. 2003), was wiederum mit einer schlechteren klinischen Verfassung, der Bildung von Mikrothromben und einer schlechteren Prognose vergesellschaftet ist (Kubo, Ogasawara et al. 2008). Durch die Freisetzung inflammatorischer Botenstoffe wird die Durchlässigkeit der Blut-Hirn-Schranke erhöht. Hierdurch wird die Diapedese von Leukozyten begünstigt, was das bereits bestehende Hirnödem verstärkt. Ebenso wird die Bildung vasokonstringierender Substanzen zur Gefäßtonusregulation induziert, mit negativem Einfluss auf die bereits bestehende Minderversorgung des Parenchyms.

Bedingt durch die lokale Entzündungsreaktion werden zudem systemische inflammatorische Prozesse in Gang gesetzt, wie Dhar und Diringer zeigen konnten. In 85% von SAB-Patienten konnten sie innerhalb der ersten vier Tage nach Blutung ein systemic inflammatory response syndrome (SIRS) nachweisen, dessen Ausmaß wiederum Einfluss auf das Gesamtüberleben hatte (Dhar and Diringer 2008).

### 1.3 Cortical Spreading Depression

Bei einem weiteren Pathomechanismus, der im Zuge der Subarachnoidalblutung auftritt, aber erst im Laufe der letzten Jahre vermehrte Aufmerksamkeit erfahren hat, steht das Auftreten von „Cortical Spreading Depolarizations (CSD)“ im Zentrum. Dabei handelt es sich um eine sich kortikal ausbreitende neuronale Massendepolarisationswelle, die mit einer beträchtlichen Verschiebung des langsamen elektrischen Potentials und dem nachfolgenden vorübergehenden Sistieren elektrischer Aktivität einhergeht, und somit zur osmotischen Schwellung von Neuronen führt. Dieses Phänomen tritt bei diversen neurologischen Krankheitsbildern auf (Lauritzen, Dreier et al. 2011).

Im Mittelpunkt der Pathophysiologie steht ein, im Tierexperiment durch einen exogenen chemischen oder mechanischen Stimulus ausgelöster, Zusammenbruch des neuronalen Ionengradienten, der konsekutiv durch die Entwicklung eines zytotoxischen Ödems und vor allem durch den Glutamat-gesteuerten Einstrom von Kationen in die Zelle aufrechterhalten wird, was eine elektrische Erregung verhindert (Dreier 2011).

Interessant in diesem Zusammenhang ist, dass gesundes Hirngewebe auf diesen Prozess mit einer kurzzeitigen transienten Minderperfusion und einer nachfolgenden deutlichen Hyperämie reagiert

(Fabricius, Akgoren et al. 1995). Im durch eine SAB vorgeschädigten Gehirn kann dieses metabolische Ungleichgewicht aber nicht hyperämisch kompensiert werden. Stattdessen kommt es nach dem Prinzip des „inverse hemodynamic response“ zu schweren Gefäßspasmen, die die Hypoxie im Gewebe weiter verstärken. Das kann im Extremfall bis zur kortikalen Nekrose, wie im Tierversuch bei Ratten nachgewiesen, führen (Dreier, Ebert et al. 2000).

In Folge der SAB werden CSDs wahrscheinlich durch eine Erhöhung des extrazellulären Kaliums – z.B. freigesetzt aus lysierten Erythrozyten oder durch die Beeinträchtigung der Na/K-ATPase – ausgelöst. Kalium besitzt ab einer Konzentration von 20 mmol/l, insbesondere während einer verminderten Verfügbarkeit des Vasodilatators Stickstoffmonoxid, vasokonstriktorisches Potential. So kann es über die Wirkung des ausgetretenen Hämoglobins als NO-Fänger (Pluta, Thompson et al. 2001) im Rahmen von CSDs während erhöhter Kaliumkonzentrationen zu einer Minderperfusion des Gewebes bis an die Ischämiegrenze mit nachfolgender sekundärer Gewebehypoxie kommen, was als alternative Ursache für die DIND nach SAB diskutiert wird (Dreier, Major et al. 2009).

Gestützt wird diese Annahme durch den Nachweis von CSDs in Kombination mit DINDs bei 72% der SAB-Patienten unterschiedlicher Schweregrade (Dreier, Woitzik et al. 2006). Konsekutiv wurde der Hypoxie-Beweis in den von CSD betroffenen Arealen geführt (Dreier, Major et al. 2009), vor allem im Zusammenhang mit Clustern von CSDs, was die Bedeutung der „cortical spreading depolarizations“ in der Pathophysiologie der Subarachnoidalblutung unterstrichen hat.

## **1.4 Thrombembolische Ereignisse**

Im sehr komplexen Zusammenspiel der Pathophysiologie der SAB sind es letztendlich Prozesse, die die ausreichende Sauerstoffversorgung der Neuronen in Gefahr bringen. Ein weiterer Mechanismus, der in diesem Zusammenhang von Relevanz ist, besteht in der Ausbildung von Thrombembolien, die konsekutiv zu Mikrozirkulationsstörungen führen. Obwohl mikroskopische Thromben in mehreren Autopsiestudien nach Subarachnoidalblutung gefunden wurden, ist deren potentielle Relevanz für den sekundären Hirnschaden nach SAB erst kürzlich in den Fokus gerückt (Vergouwen, Vermeulen et al. 2008). Nachdem im Rahmen von transkraniellen Verlaufssonographien (transcranial Doppler ultrasound, TCD) bei 70% der Patienten Mikroembolie-Signale entdeckt und in Zusammenhang mit Infarktzeichen gebracht wurden (Romano, Rabinstein et al. 2008), hat man nach Querverweisen zur Pathophysiologie der SAB gesucht.

Im Tiermodell hat man eine zerebrale Thrombozytenaggregation schon sehr früh nach der Blutung nachweisen können (Sehba, Mostafa et al. 2005) und auch im Jugularvenenblut von Patienten hat man Marker für eine frühe Aktivierung der Gerinnungskaskade in Kombination mit proinflammatorischen Botenstoffen gefunden (Hirashima, Nakamura et al. 1997). Es konnte gezeigt werden, dass diese beiden Mechanismen Hand in Hand gehen und sich gegenseitig verstärken

(Prunell, Svendgaard et al. 2005). Die Effekte einer übermäßigen Aktivität der Gerinnungskaskade sind mannigfaltig. Gerinnsel können Gefäße mechanisch verschließen, über die Zerstörung des Endothels zu weiterer Thrombozytenaggregation führen und konsekutiv die Gefäßwände durch die Freisetzung von Matrix-Metalloproteasen direkt schädigen (Mun-Bryce and Rosenberg 1998).

Diese Gerinnsel können aber auch in die Mikrozirkulation ausgeschwemmt werden und zu ischämischen Läsionen führen (Rapp, Pan et al. 2003). Gestützt wird diese These durch das in Autopsiestudien nach SAB gefundene typische Infarktmuster mit kleinen, weitverteilten laminaren oder keilförmigen Ischämien (Neil-Dwyer, Lang et al. 1994), das gegen einen Verschluss großer Gefäße spricht.

Untermauert wird die Beteiligung thrombembolischer Ereignisse an der Ausbildung ischämischer Folgeschäden der SAB durch den Nachweis der fibrinolytischen Aktivität von Calcium-Antagonisten (Vergouwen, Vermeulen et al. 2007), der bisher einzigen Substanzgruppe, die die Prognose von SAB-Patienten nachweislich verbessern kann (Dorhout Mees, Rinkel et al. 2007).

## 1.5 Zerebraler Vasospasmus

Allen bisher aufgeführten Mechanismen ist das Auftreten sekundärer Ischämien gemeinsam, die den Patienten nach überstandener Blutung erneut vital bedrohen. Als Ursache dafür hat man über lange Zeit den zerebralen Vasospasmus angenommen (Kassell, Sasaki et al. 1985). Dabei handelt es sich um einen bei 70% der Patienten angiographisch ab dem 3. Tag nach SAB nachweisbaren Gefäßspasmus der großen hirnversorgenden Gefäße.

Die Pathophysiologie dahinter wurde in den letzten Jahrzehnten aufgrund der Häufigkeit, der potentiellen therapeutischen Interventionsmöglichkeiten und der starken Koinzidenz mit Morbidität und Mortalität nach SAB extensiv erforscht (Komotar, Zacharia et al. 2007, Crowley, Medel et al. 2008). Kurz zusammengefasst lässt sich Folgendes festhalten: Ausgehend vom subarachnoidalen Gerinnsel wird Oxyhämoglobin freigesetzt, das aufgrund seiner Affinität zu Stickstoffmonoxid zum Absinken des NO-Spiegels führt (Asano 1999). Konsekutiv kommt es zu einem Ungleichgewicht in der Gefäßtonusregulation, da Endothelin-1 (ET-1), ein sehr starker physiologischer Vasokonstriktor, erhöht ist. Dieser Sachverhalt ist ebenfalls auf die Präsenz von Oxyhämoglobin und Thrombin zurückzuführen. Es wurde gezeigt, dass ET-1 sowohl langanhaltende Vasokonstriktionen (Kobayashi, Hayashi et al. 1991) als auch die typischen morphologischen Veränderungen in der Gefäßarchitektur nach SAB auslösen kann (Asano, Ikegaki et al. 1990). Aufgrund zahlreicher sich verstärkender Interaktionen, ergibt sich ein sehr verzweigtes, vielschichtiges Bild (Hansen-Schwartz 2004, Nishziawa 2011), was es wiederum schwierig macht sich diesem Problem therapeutisch zu nähern.

Allerdings wird in letzter Zeit die bisher postulierte zentrale Bedeutung des Vasospasmus der großen hirnversorgenden Gefäße als wesentliche Ursache für verzögert auftretende neurologische Defizite

vermehrt in Frage gestellt. So hat sich in den letzten Jahren gezeigt, dass der „angiographische“ Vasospasmus nicht immer mit dem „symptomatischen“ Vasospasmus, also dem Auftreten sekundärer ischämischer Defizite, die nur bei 22% aller Patienten vorkommen, korreliert (Stein, Levine et al. 2006, Vergouwen, Ilodigwe et al. 2011).

Zudem ist hervorzuheben, dass in einem Drittel der Fälle der Vasospasmus örtlich nicht mit der letztendlichen ischämischen Läsion korreliert, wie Rabinstein et al. zeigen konnten (Rabinstein, Friedman et al. 2004). Auch der Schweregrad des Vasospasmus und der Ischämie entsprechen sich nicht immer. Darüber hinaus gibt es Fälle von Infarkten unabhängig von zugrundeliegenden Gefäßspasmen (Rowe, Soper et al. 1995). Wie bereits oben erwähnt, passen auch die in Autopsien gefundenen Infarktmuster nicht zum Konzept des Vasospasmus der großen hirnversorgenden Gefäße. Zugleich wird der therapeutische Mehrwert von Vasodilatoren für Patienten bezogen auf ischämische Spätschäden nach SAB kontrovers gesehen. Hervorzuheben sind hierbei die Ergebnisse der CONSCIOUS (Clazosentan to Overcome Neurological Ischemia and Infarction Occuring after Subarachnoid Hemorrhage)- Studien. In diesen brachte die Verminderung des angiographischen Vasospasmus um bis zu 67% durch die Blockade von Endothelin-1-Rezeptoren keine signifikante Verbesserung des Outcomes der Patienten (Macdonald, Kassell et al. 2008).

Das heutige Konzept der Pathophysiologie der SAB sieht eine eindeutige kausale Verbindung zwischen der frühen Schadensentwicklung und den verzögert auftretenden Defiziten. So wurden, wie oben dargestellt, die zu angiographisch nachweisbaren Gefäßverengungen führenden Mechanismen, wie das Ungleichgewicht der vasokonstriktischen und - dilatatorischen Mechanismen, die Bildung von Spasmogenen durch hämoglobin-induzierte Prozesse, die inflammatorische Komponente, als auch die Verknüpfung mit thrombembolischen Ereignissen ebenfalls in der akuten Phase nach SAB nachgewiesen (Sehba and Bederson 2006, Cahill and Zhang 2009). Dazu kommt, dass das Auftreten von frühen Störungen in der Mikrozirkulation als signifikanter Beitrag zur Pathophysiologie der SAB vermutet wird (Sehba and Friedrich 2013).

So war es Ziel der hier vorliegenden Arbeit, das Bildgebungsverfahren der „Multi Spectral Optoacoustic Tomography“ (MSOT) in Bezug auf die Darstellung des Mikrovasospasmus, der nicht nur im Tierexperiment gezeigt (Friedrich, Muller et al. 2012), sondern auch beim Menschen bereits intraoperativ nachgewiesen wurde (Uhl, Lehmborg et al. 2003), und dessen Folgen unmittelbar nach der Blutung und im weiteren Verlauf in der Maus zu evaluieren und die Analyse weiterzuentwickeln. Ein nicht-invasiv anwendbares Hypoxie-Bildgebungsverfahren würde es ermöglichen, in präklinischen Studien die Wertigkeit des Mikrovasospasmus bei der Entwicklung der Folgeschäden der SAB engmaschig im zeitlichen Verlauf im Detail untersuchen zu können.

In einem ersten Schritt wurde zur Abschätzung des Potentials der Bildgebung mittels MSOT zur Darstellung hypoxischer Areale dieses Bildgebungsverfahren zunächst im Modell der fokalen

zerebralen Ischämie an der Maus angewendet, da hier klar definierte Areale mit Minderperfusion und Hypoxie innerhalb einer Hemisphäre vorliegen und ein Seitenvergleich möglich ist. Deshalb gehe ich im Folgenden kurz auf die Pathophysiologie des ischämischen Schlaganfalls ein, wobei nur die für das Verständnis dieser Arbeit relevanten Aspekte dargestellt werden.

## 1.6 Das Penumbra-Konzept

Beim ischämischen Schlaganfall kommt es zu einer umschriebenen plötzlichen Unterbrechung der Blutversorgung des Gehirns. Die häufigsten Ursachen stellen die Entstehung von Thromben im zerebralen Gefäßbett oder das Ausschwemmen abgelöster Emboli in die Strombahn des Gehirns dar. Da das Gehirn, basierend auf seinem hohen Energieumsatz, auf die kontinuierliche Bereitstellung von Substraten, vor allem Sauerstoff und Glucose, angewiesen ist, kommt es bereits nach kurzer Zeit zum Absterben von Zellen. Das Ausmaß dieses Prozesses wird durch mehrere Faktoren bestimmt: i) durch den Grad des Gefäßverschlusses, ii) seine Kompensation durch Kollateralisierung, sowie iii) durch die Zeitdauer bis zur Wiederherstellung einer ausreichenden Durchblutung.

Da es sich dabei um - zeitlich wie räumlich - dynamische Prozesse mit fließenden Übergängen handelt, hat man basierend auf Untersuchungen Ende der 70er Jahre in Tiermodellen, bei denen der Blutfluss im Gehirn sukzessive gesenkt wurde, festgestellt, dass es Areale um den bereits nekrotischen Kern gibt, die zwar funktionell kompromittiert, aber noch nicht strukturell irreversibel geschädigt sind (Astrup, Siesjo et al. 1981). Diese können daher durch schnellstmögliche Reperfusion vor dem Zelluntergang bewahrt werden. Diese Bereiche wurden „Penumbra“ genannt, nach dem Saum, der bei einer totalen Sonnenfinsternis von der Sonne noch zu sehen ist. Im Laufe der Zeit haben Experimente gezeigt, dass sich die zu Beginn der Infarzierung vorhandene Penumbra bei ausbleibender Wiederdurchblutung nekrotisch transformiert (Hata, Maeda et al. 2000). Daher ist es primäres Ziel jeder Therapie des ischämischen Schlaganfalls durch zeitnahe Reperfusion den Großteil dieses gefährdeten Gewebes zu erhalten. Ein nachgewiesener Effekt dieser Behandlung ist aber nur für ein Zeitfenster von unter 4,5 Stunden vorhanden (Lees, Bluhmki et al. 2010). Da aufgrund oft unklarer Auffindesituationen und der großen Anzahl an sog. „Wake-up-Stroke“ das „Lysefenster“ von 4,5 Stunden nicht immer klar abzugrenzen ist, profitiert nur ein überschaubarer Prozentsatz der Patienten mit ischämischen Schlaganfall von dieser Therapie. Weil zusätzlich die Auflösung der verursachenden Thromben mit einem erhöhtem Blutungsrisiko und weiterführenden Komplikationen verbunden ist, ist es von entscheidender Bedeutung zu wissen, ob noch bedrohtes, aber vitales Gewebe vorhanden ist, das eine Intervention rechtfertigt.

In den letzten Jahren sind daher bildgebende Verfahren entwickelt worden, die eine Abschätzung der Penumbra erlauben. Als Goldstandard hierbei ist die Positronen-Emissions-Tomographie (PET) zu sehen, die über die Verteilung radioaktiv markierter Substanzen im Gehirn die Quantifizierung der

Durchblutungssituation ermöglicht. Das wiederum erlaubt indirekte Rückschlüsse über die Vitalität des Gewebes. Allerdings stehen der damit verbundene technische Aufwand und die geringe Verfügbarkeit der PET einer flächendeckenden Verwendung in der klinischen Routine entgegen.

In ihrer breiten Anwendung haben sich vor allem das MRT und das CT als diagnostische Verfahren etabliert. Über jeweils verschiedene Ansätze erlauben sie die Abschätzung des ischämischen Schadens im Gehirn. Das CT bedient sich hierbei der Verteilung eines definierten Kontrastmittelbolus im Gehirn. Dadurch lassen sich Parameter wie der zerebrale Blutfluss und das zerebrale Blutvolumen bestimmen. Der Abfall des CBF im CT deutet auf bereits nekrotisches Gewebe hin, wohingegen ein erhöhtes CBV Hinweis auf eine verstärkte Vasodilatation, also eine Rekrutierung von Kollateralkreisläufen sein kann. Die Aussagekraft ist bei der derzeitigen Möglichkeit der Darstellung von maximal vier Schnittebenen eingeschränkt, das CT hat aber in vor kurzem durchgeführten Studien seine Wertigkeit gezeigt (Wintermark, Meuli et al. 2007). Vor allem seine Bedeutung als diagnostisches Mittel der Wahl bei Verdacht auf einen Schlaganfall, die kurzen Untersuchungszeiten und die hohe Verfügbarkeit machen das CT zur Abschätzung der Penumbra attraktiv.

Die Kernspintomographie nähert sich der Penumbra durch eine andere Herangehensweise. Eine diffusions-gewichtete Sequenz (DWI) zeigt die durch den Zelluntergang im Infarktkern entstehende Umverteilung des Wassers als hyperintense Läsion. Mittels einer perfusions-gewichteten Sequenz (PWI) lässt sich der Abfall der Durchblutung sowohl im Kern als auch in der Penumbra quantifizieren. Aus der Subtraktion beider Volumina lässt sich das Ausmaß der Penumbra bestimmen. Wie bei der CT-Untersuchung gibt es bei der MRT aber auch Nachteile, die im Zuge großer Studien mit der Fragestellung der Penumbradarstellung als Maßgabe zur Therapieentscheidung offenkundig wurden (Davis, Donnan et al. 2008, Hacke, Furlan et al. 2009). Zum Beispiel überschätzt die PWI das Ausmaß der Penumbra in vielen Fällen, weil minderdurchblutete, aber nicht vital bedrohte Areale auch mit abgebildet werden. Außerdem wurde gezeigt, dass Diffusionsstörungen nicht wie vermutet irreversibel sind, sondern sich im Verlauf auch wieder zurückbilden können.

Daher stellt sich nach wie vor die Frage einer zuverlässigen Bildgebung zur Darstellung der Penumbra, die exakt und reproduzierbar ist und direkt Rückschlüsse auf das Ausmaß der Ischämie erlaubt. Laut Heiss kennzeichnet die Penumbra in der PET eine erhöhte Sauerstoffextraktionsrate im Vergleich zum umliegenden intakten Gewebe (Heiss 2000). Da es über eine Spektroskopie möglich ist, im MSOT den O<sub>2</sub>-Verbrauch im Gehirn abzubilden, wurde die Hypothese einer Penumbrabildgebung mittels MSOT in einem Fadenmodell des ischämischen Schlaganfalls in der Maus überprüft.

## **1.7 Bildgebung im experimentellen Schlaganfallmodell**

### **1.7.1 Allgemeiner Überblick über tierexperimentelle bildgebende Verfahren**

Die modernen bildgebenden Verfahren bieten vielfältige Möglichkeiten, neben der Diagnostik pathophysiologische Beobachtungen im Verlauf zu machen. Im Laufe der letzten Jahre wurde eine Vielzahl neuer Möglichkeiten entdeckt oder weiterentwickelt, die zum Verständnis von Erkrankungen beigetragen haben. Weil aufgrund der zahlreichen Neuerungen der letzten Jahre der Markt sehr unübersichtlich geworden ist, werde ich mich im Folgenden auf tierexperimentelle Bildgebungsmodalitäten beschränken. Da gilt es in erster Linie die etablierten, auch klinisch eingesetzten Verfahren wie CT und MRT zu nennen, die mit dementsprechenden Modifikationen an die Bedürfnisse der Kleintierbildgebung angepasst werden können (Hu and Norris 2004, Ritman 2011).

Daneben bieten sich in der präklinischen Forschung auch invasivere Methoden an, einerseits angepasst an die jeweiligen Fragestellungen, andererseits unter der Berücksichtigung der Limitationen der einzelnen Techniken. Vor allem optische Methoden haben in diesem Bereich einen hohen Stellenwert, weil sie hohen Kontrast bei geringem technischem Aufwand bieten. Allerdings gibt es Beschränkungen hinsichtlich sowohl der reinen Verwendung ex-vivo, als auch der Größenauflösung der Lichtmikroskopie, die durch das Spektrum des sichtbaren Lichts limitiert ist.

Aus diesem Grund hat man mehrere Methoden entwickelt mit denen diese Probleme umgangen werden sollen. Zu nennen sind hier exemplarisch die Intravital-Mikroskopie, die sowohl Auflösung im Mikrometer-Bereich als auch die Echtzeit-Darstellung dynamischer Prozesse erlaubt, aber aufgrund ihrer nur oberflächlichen Anwendbarkeit bei der Beurteilung dreidimensionaler Strukturen eingeschränkt ist. Das können wiederum die Konfokale Mikroskopie und die Zwei-Photonen-Mikroskopie bei Auflösung im Mikrometerbereich gewährleisten, was sie in der Forschung sehr populär hat werden lassen. Einer breiten Anwendung stehen dabei aber der technische Aufwand und bei der Zwei-Photonen-Mikroskopie zusätzlich die hohen Kosten für den benötigten Titan:Saphir-Laser entgegen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass diese Methoden Beschränkungen aufweisen und keine einen ganzheitlichen Zugang bietet (Hu and Wang 2010). Demgegenüber soll es mittels optoakustischer Verfahren möglich sein, diese Limitationen zu umgehen (Wang 2009), weswegen sie im nächsten Kapitel näher charakterisiert werden.

### **1.7.2 Grundlagen der „Multi Spectral Optoacoustic Tomography (MSOT)“**

Bei der „Multi Spectral Optoacoustic Tomography“ handelt es sich um ein in-vivo bildgebendes Verfahren, das die simultane Akquisition anatomischer, funktioneller und molekularer Bilddaten

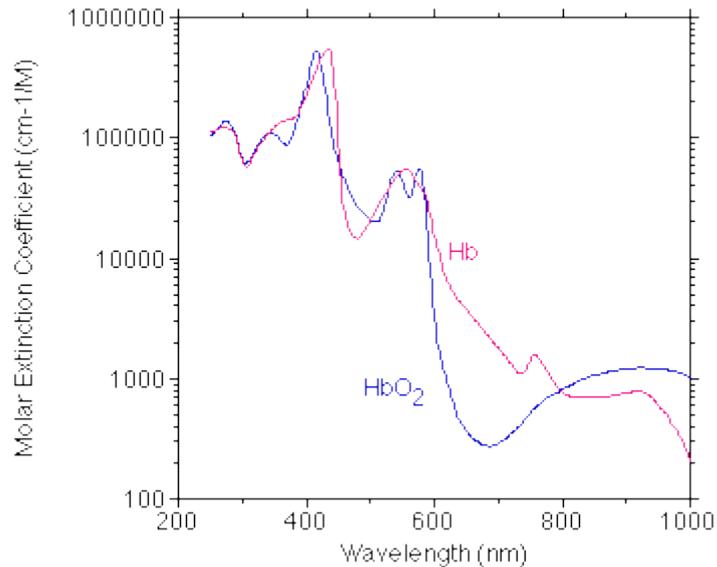
erlaubt, basierend auf der Kombination optischer Bildgeneration und akustischer Bilddetektion, was vielfältige Anwendungsmöglichkeiten in der experimentellen Forschung ermöglicht.

Theoretische Grundlage für alle optoakustischen Methoden ist der bereits im 19. Jahrhundert entdeckte „Photoakustische Effekt“, der die Generation von Schallwellen im Gewebe nach Lichteinwirkung beschreibt. Mechanistisch führt die Absorption von Lichtenergie in Form eines Photons im Gewebe über eine thermoelastische Umwandlung zum Anstieg der Temperatur. Durch die damit verbundene vermehrte Molekularbewegung kommt es nach der allgemeinen Gasgleichung zum Druckanstieg, der sich als Schallwelle äußert und von einem Ultraschalldetektor registriert werden kann.

Allerdings hat erst die Verfügbarkeit von Lasern mit Pulsgeschwindigkeiten im Nanosekundenbereich und die erhöhte Sensitivität neuerer Ultraschalldetektoren zur Nutzbarmachung dieses Effekts für die Bildgebung geführt. Da es sich um die Detektion von Schallwellen handelt, ist die räumliche Auflösung durch die Diffraktionsgrenze von Ultraschallwellen limitiert, die weit unter derjenigen optisch basierter Verfahren liegt. Prinzipiell ist damit eine Auflösung von unter 20µm in oberflächlichen Geweben möglich und selbst bei mehreren Zentimetern Eindringtiefe kann noch eine 100µm-Auflösung gewährleistet werden (Ntziachristos and Razansky 2010).

Die anatomische Information über das Gewebe wird vor dem Hintergrund der unterschiedlichen Absorptionsspektren entweder endogener Chromophore, d.h. farbiger Moleküle, oder über den Einsatz exogener Substanzen zur Verbesserung des Kontrastes gewonnen. Abbildung 1 zeigt das Absorptionsspektrum von Hämoglobin, dem am häufigsten verwendeten Chromophor.

Aus Abbildung 1 wird ebenfalls ersichtlich, dass das ubiquitär vorkommende Hämoglobin sein Absorptionsmaximum im sichtbaren Wellenlängenbereich hat, was den Lichtfluss in diesem Spektralbereich somit erheblich limitieren würde. Daher wird auf den Infrarotbereich ausgewichen, der eine bessere Tiefenpenetration erlaubt.



**Abbildung 1: Absorptionsspektrum des Hämoglobins (Hb = deoxygeniertes Hämoglobin; HbO<sub>2</sub> = oxygeniertes Hämoglobin; mit freundlicher Genehmigung von Prof. Scott Prahl)**

Aus den Absorptionsspektren wird auch nachvollziehbar, dass es, basierend auf einer Spektroskopie, d.h. einer Aufschlüsselung nach bestimmten Wellenlängen, mittels MSOT möglich ist, funktionelle Daten vor allem über den Oxygenierungsgehalt verschiedener Gewebe zu verschiedenen Zeitpunkten zu erheben. Dazu ist es aber nötig, anhand der gewonnenen Informationen die Konzentrationen gesuchter Substanzen quantifizieren zu können, was mit technischem Aufwand unter Verwendung von Rekonstruktionsalgorithmen möglich ist (Cox, Laufer et al. 2012). Vor kurzem gelangen Laufer et al. die Implementierung dieser Methoden für das Hämoglobin (Laufer, Delpy et al. 2007), sodass mit dem MSOT eine Aussage über den Sauerstoffgehalt im Blut zu treffen ist. Da es sich um ein ultraschall-basiertes Verfahren handelt, ist auch die Bildgebung in Echtzeit möglich, was die Beobachtung dynamischer Prozesse in verschiedensten Geweben ermöglicht.

Allerdings gibt es, wie bei jedem bildgebenden Verfahren, einschränkende Faktoren, was bei der Optoakustik die genaue Kenntnis des optischen Flusses ist. Auf seinem Weg durch das Gewebe kommt es zu mannigfaltigen Wechselwirkungen der Photonen, so dass nicht von einer homogenen Durchleuchtung ausgegangen werden kann. Gleichzeitig handelt es sich um nichtlineare Zusammenhänge von Konzentrationsänderungen und Signalstärke, weil die Gewebestruktur, die Tiefe des Gewebes und das zu untersuchende Volumen darauf Einfluss haben (Ntziachristos and Razansky 2010). Unter Zuhilfenahme mathematischer Operationen und komplexer Algorithmen wird versucht, die Genauigkeit dieser Abschätzung zu erhöhen und somit die Korrektheit der erhobenen Daten zu gewährleisten.

Von verschiedenen Arbeitsgruppen wurde die Wertigkeit des MSOTs in der Kleintierbildgebung des Gehirns sowohl strukturell (Wang, Pang et al. 2003) als auch funktionell (Burton, Patel et al. 2013) nachgewiesen. Unter Berücksichtigung der breiten Anwendbarkeit des MSOTs, namentlich die oben

erwähnte Spektroskopie, ist das MSOT für die Überprüfung unserer Thesen für die Darstellung der frühen Phase nach experimentieller Subarachnoidalblutung und nach experimentellem Schlaganfall gewählt worden.

### **1.7.3 Bildgebungsstudien zur frühen Pathophysiologie nach Subarachnoidalblutung**

In diesem Zusammenhang war es jedoch von Bedeutung, den aktuellen Stand der Forschung zur Pathophysiologie der Subarachnoidalblutung aus Bildgebungsstudien zu kennen. Da es sich bei den neueren, zur funktionellen Evaluierung fähigen, bildgebenden Verfahren um Entwicklungen der letzten Jahre handelt, ist in der Vergangenheit die zerebrale Zirkulation mittels anderer Methoden bestimmt worden. In den 80er Jahren gab es umfangreiche Untersuchungen mit der Xe-133-Einwaschmethode, die die Akutsituation und den klinischen Verlauf nach SAB abbilden sollten (Knuckey, Fox et al. 1985). Hier hat sich bereits eine Verminderung des zerebralen Blutflusses über längere Zeit gezeigt.

Durch die Einführung der MRT, sowohl in Diagnostik als auch Verlaufskontrolle, konnte man dann auch direkt die Abläufe im Gehirn nachvollziehen. Zuerst für den ischämischen Schlaganfall im Tierexperiment (Sevick, Kucharczyk et al. 1990, Pierpaoli, Alger et al. 1996) und im Menschen (Warach, Chien et al. 1992) etabliert, ging man Ende der 90er Jahre dazu über diese Methoden auf die SAB anzuwenden. Wie Busch et al. an Ratten im DWI-MRT gezeigt haben fällt unmittelbar nach Blutung der „apparent diffusion coefficient (ADC)“ ab, was als Störung der zellulären Integrität, möglicherweise ischämisch bedingt, gedeutet werden kann (Busch, Beaulieu et al. 1998). Im gleichen Experiment wurden auch Zeichen für eine CSD gesehen, was von der gleichen Arbeitsgruppe noch einmal bestätigt wurde und auf eine Beteiligung der CSD bereits in der Akutphase der SAB in Ratten hindeutet.

Vom einem ähnlichen Ansatz gingen Schubert et al. aus, die die Durchblutungsverhältnisse direkt nach der SAB in der Ratte näher charakterisiert haben. Neben metabolischen Störungen wurde mit Hilfe der DWI-MRT und MR-Spektroskopie die Entwicklung einer Hypoperfusion, begleitet von einem zytotoxischen Ödem, beobachtet, sowie dessen positive Beeinflussung durch eine Hypothermie von 32°C (Schubert, Poli et al. 2008). Dort wurde ebenfalls postuliert, dass - repräsentiert durch das metabolische Ungleichgewicht - die Akutphase der SAB durch einen dramatischen Hypometabolismus gekennzeichnet ist, der auch prognostische Aussagekraft hat (Sarrafzadeh, Haux et al. 2004).

Aufbauend darauf wurde in dieser Arbeitsgruppe eine Xenon-Kontrast-CT-Studie an Patienten durchgeführt, um den zerebralen Blutfluss binnen 12 Stunden nach Aneurysmaruptur darstellen zu können (Schubert, Seiz et al. 2009). Dabei hat sich gezeigt, dass vor allem kortikale Bereiche von der Minderdurchblutung betroffen sind, wohingegen subkortikale Strukturen dafür nicht so anfällig zu

sein scheinen. Ebenso wurden Korrelationen des Ausmaßes der Hypoperfusion und des Hunt & Hess-Grades gesehen, was den prognostischen Wert dieses Parameters unterstreicht.

Ausgehend davon sollte in unserer Arbeit der Verlauf, das Ausmaß und die Bedeutung der akuten Minderperfusion für das Schadensprofil der SAB evaluiert werden. Zugleich stellt die Auflösung bei vielen Modalitäten den limitierenden Faktor dar, weswegen viele Erkenntnisse aus Bildgebungsstudien auf Experimenten an Ratten beruhen. Dementsprechend dünn ist daher noch die Datenlage zur wesentlich kleineren Maus. Diese bietet aber mit ihrer Bandbreite genetischer Modifizierbarkeit für die Zukunft große Potentiale. Die „Multi Spectral Optoacoustic Tomography“ sollte diesem Anspruch, funktionelle Bildgebung mit ausreichender Auflösung im Mausmodell zu gewährleisten und so neue Informationen zur Pathophysiologie der SAB beizutragen, gerecht werden. Zudem bietet das Mausmodell gegenüber größeren Spezies gerade wegen der geringeren Hirngröße Vorteile bezüglich der Eindringtiefe der optischen Signale.

## **1.8. Artificielle Sauerstoffträger bei neurologischen Krankheitsbildern**

Der in bisherigen tierexperimentellen Untersuchungen gezeigte Blutflussabfall bereits in der Frühphase nach SAB lässt vermuten, dass es auch früh schon zu einer Gewebehypoxie kommt. Deshalb habe ich im Rahmen meiner Dissertationsarbeit parallel zur Etablierung des bildgebenden Verfahrens MSOT zum möglichen Nachweis einer Hypoxie in einer ersten Pilotstudie überprüft, ob eine Verbesserung der Sauerstoffversorgung des Gewebes mittels artifizierlicher Sauerstoffträger auch zu einem verbesserten Outcome in der Frühphase nach SAB führt. Im Folgenden wird daher ein kurzer Überblick über die Wirkungsweise und den Einsatz artifizierlicher Sauerstoffträger gegeben.

### **1.8.1 Arten künstlicher O<sub>2</sub>-Transport-Komponenten**

Sauerstoffersatzmittel wurden ursprünglich für die Traumatologie entwickelt, um den wachsenden Bedarf an Blutkonserven einerseits und die damit verbundenen infektiösen, immunologischen und logistischen Probleme andererseits umgehen zu können (Kim and Greenburg 2004).

Grundsätzlich wird zwischen hämoglobin-basierten Sauerstofftransportern und synthetischen O<sub>2</sub>-Trägern unterschieden. Hämoglobin-basierte Sauerstoffträger (HBOC) haben allerdings im Rahmen klinischer Studien ihre Wirksamkeit bisher nicht unter Beweis stellen können (Winslow 2006). Im Gegenteil wurden toxische Effekte mit Interaktionen in vielen unterschiedliche Systemen des Körpers beobachtet, so dass es bis dato keinen HBOC auf dem Markt gibt (Kawaguchi 2009). Im Folgenden werde ich daher nur auf synthetische O<sub>2</sub>-Träger eingehen und mich hier auf die in der Pilotstudie eingesetzten Derivate der Perfluorocarbone beschränken.

### 1.8.2 Charakterisierung von Perfluorocarbonen

Perfluorocarbone erhöhen die Sauerstofftransportkapazität im Blut, indem sie die physikalische Löslichkeit von O<sub>2</sub> im Blut steigern (Faithfull 1992). Allerdings verhalten sich dessen Lösungseigenschaften nach dem Henry-Gesetz. Dieses besagt, dass sich die Löslichkeit eines Gases in Flüssigkeiten direkt proportional zu seinem Partialdruck verhält, weswegen zur optimalen Oxygenierung der Sauerstoffpartialdruck angepasst werden muss und immer mit 100% Sauerstoff beatmet werden sollte.

Bei der Substanzgruppe der PFCs handelt es sich um fluorinierte Abkömmlinge von Alkyl-Ketten, die wiederum das Grundgerüst aller organischen Substanzen bilden. Durch die speziellen sterischen Eigenschaften, verbunden mit der hohen Bindungsenergie zwischen den Perfluoroalkylketten, sind diese sehr reaktionsträge und chemisch praktisch inert. Diese Biotoleranz in Kombination mit ihrer Hydrophobizität macht PFCs, neben der Verwendung als Ultraschall-Kontrastmittel (Schutt, Klein et al. 2003), als Sauerstoffträger sehr interessant, weil es zu keinen Interaktionen mit dem Stoffwechsel, wie bei den HBOCs, kommen kann.

Die hohe Löslichkeit der PFCs für Sauerstoff beruht auf ihrer extrem niedrigen Polarisierbarkeit, was zu geringen intermolekularen Kräften und dadurch geringer Kohäsion führt, sodass sich zwischen den PFC-Molekülen große Mengen von unpolaren Gasen „lösen“ lassen. Dies ist nicht im Sinne einer chemischen Bindung zu verstehen, sondern als rein elektrodynamische Wechselwirkung. Das wiederum ermöglicht eine leichte Abgabe des Sauerstoffs an das Gewebe, allerdings bei einer 20-fach höheren Löslichkeit für O<sub>2</sub> als Wasser (Riess 2005) .

Die oben angesprochenen hydrophoben Eigenschaften erschweren jedoch den Einsatz von PFCs als Sauerstoffträger im Blut, weswegen sie über Emulgatoren in Wasser löslich gemacht werden müssen. Die Gewährleistung der Stabilität dieser Emulsionen erfordert ein gewisses Gewicht, wohingegen eine adäquate Ausscheidung aus dem Körper einen Grad an Flüchtigkeit bedingt. Letzten Endes sollen die Emulgatoren keine unerwünschten Interaktionen hervorrufen, die Partikel aber klein genug sein, um die Sauerstoffversorgung auch in verengten Gefäßen gewährleisten zu können. Nachdem diese Probleme überwunden wurden, waren klinische Anwendungen möglich, wie im nächsten Kapitel ausgeführt.

### 1.8.3 Perfluorocarbone zur Sekundärprophylaxe der zerebralen Ischämie

Es erscheint auf den ersten Blick schlüssig, vor allem aufgrund der Größe von durchschnittlich 0,2 µm PFCs zur Aufrechterhaltung oder Wiederherstellung der zerebralen Perfusion nach einem ischämischen Schlaganfall einzusetzen. Denn im Vergleich zu Erythrozyten mit ihren 7µm Durchmesser sollte es für PFCs möglich sein, selbst in spastischen oder thrombosierte Gefäßen noch Sauerstoff an das umliegende Gewebe abgeben zu können, zumal gezeigt wurde, dass der Plasmafluss nie ganz zum Erliegen kommt (Theilen, Schrock et al. 1994).

Ausgehend von diesen Überlegungen hat man mit Fluosol-20, dem ersten marktreifen PFC, experimentelle Tierstudien zur transienten oder permanenten Ischämie durchgeführt. Vor allem histologische Parameter wie die Infarktgröße wurden zur Evaluation protektiver Effekte herangezogen, aber auch funktionelle Daten wie der CBF. Bei vielen dieser Studien wurde gezeigt, dass es eine positive Korrelation zwischen der Gabe von Fluosol-20 und dem letztendlichen Infarktschaden gab, die sich aber aus verschiedenen Gründen nicht in die Klinik übertragen ließen.

Mit der Entwicklung neuerer Perfluorocarbone einerseits und der Erkenntnis andererseits, dass die Beeinträchtigung des Gefäßsystems beziehungsweise der Sauerstoffversorgung eine gemeinsame Komponente vieler neurologischer Erkrankungen darstellt, hat man die Indikation für den Einsatz von PFCs erweitert. Veränderte PFCs, sei es aufgrund einer sterischen Änderung (Woitzik, Weinzierl et al. 2005), oder aufgrund modifizierter physikalischer Eigenschaften (Culp, Woods et al. 2012), haben protektive Effekte in tierexperimentellen Modellen des ischämischen Schlaganfalls gezeigt. Selbst beim nahezu vollständigen Ersatz des Plasmavolumens durch PFCs im Rahmen einer kontrollierten Hämodilution konnte eine ausreichende zerebrale Oxygenierung gewährleistet werden (Yang, Price et al. 2008).

Auch in Schädelhirntrauma-Modellen in Ratten konnte sowohl eine Verminderung der Hypoxie durch Erhöhung des regionalen Blutflusses beobachtet werden (Daugherty, Lefebvre et al. 2004) als auch Verbesserungen der kognitiven Leistungen im Vergleich zu Kontrolltieren, sodass klinische Studien zum Nachweis dieser protektiven Effekte im Menschen aktuell durchgeführt werden (Spiess 2009).

Wie im ersten Teil der Einleitung bereits ausgeführt, ist es auch bei der SAB letztendlich eine Mikrozirkulationstörung mit nachfolgender Minderperfusion im Parenchym, die wesentlich zum Schadensprofil nach der SAB beiträgt. Allerdings ist die Datenlage der Gabe von PFCs im Zusammenhang nach SAB noch unergiebig. Daher war es ein weiterer Aspekt dieser Arbeit, für Oxycyte<sup>®</sup>, ein neueres ringförmiges Perfluorocarbon, das neuroprotektive Eigenschaften bereits in einem Ischämiemodell der Ratte unter Beweis gestellt hat (Woitzik, Weinzierl et al. 2005), eine erste Standortbestimmung bezüglich einer möglichen Protektion in der Frühphase nach SAB vorzunehmen, um in weiteren Studien darauf aufbauend umfangreiche Untersuchungen bezüglich Applikation, Dosisfindung und Effekten auf physiologische und kognitiv-behaviourale Parameter nach experimenteller Subarachnoidalblutung in der Maus durchzuführen.

## 1.9 Hypothesen dieser Arbeit

Abschließend möchte ich die Zielsetzung dieser Arbeit kurz zusammenfassen: 1. Ist es mittels „Multi Spectral Optoacoustic Tomography“ möglich, in einem Mausmodell fokaler Ischämie diese eindeutig, reproduzierbar und ortsgenau darzustellen? 2. Ist eine signifikante Hypoperfusion in der Frühphase der SAB, in Analogie zur Referenzbildgebung der fokalen Ischämie, ebenfalls auszumachen und wenn

ja in welcher Form? 3. Kann konsekutiv das Blutungsausmaß einer Subarachnoidalblutung unter Zuhilfenahme des MSOTs quantifiziert werden? 4. Zu guter Letzt gingen wir in einer ersten Pilotstudie der Frage nach, ob Perfluorocarbone als artifizielle Sauerstoffträger neuroprotektive Effekte bei Gabe unmittelbar nach Subarachnoidalblutung aufweisen.

## 2 Material und Methoden

Alle Versuche wurden von 2011 bis 2012 in den Räumen des Forschungslabors der Experimentellen Neurochirurgie der Neurochirurgischen Klinik des Klinikums rechts der Isar der TU München und am Institut für Biologische und Medizinische Bildgebung (IBMI) der TU München am Helmholtz-Zentrum für Umwelt und Gesundheit in München-Neuherberg mit der Genehmigung der Regierung von Oberbayern (AZ-Genehmigungsnummern: 55.2-1-54-2531-70-10, 55.2-1-54-2532.2-6-10, 55.2-1-54-2532.2-1-12) durchgeführt.

### 2.1 Versuchstiere

Die Verwendung des MSOT erforderte aufgrund der durch Behaarung verursachten Interferenzphänomene bei der Detektion der Ultraschallwellen die Experimente an haarlosen Mäusen. Es kamen daher haarlose, immunkompetente Mäuse (männlich, sechs Wochen alt) des Stammes Crl:SKH-1<sup>Hhr</sup> (Charles River Laboratories, Sulzfeld, Deutschland) zum Einsatz. Für die Versuche mit Injektion von Oxycyte<sup>®</sup> (Oxygen Biotherapeutics Inc., Morrisville, USA) wurden männliche C57Bl/6N-Mäuse (Charles River Laboratories, Sulzfeld, Deutschland) mit einem Gewicht von 20-22 g eingesetzt. Alle Tiere wurden unter kontrollierten Bedingungen mit freiem Zugang zu Wasser und Nahrung (Altromin 1324 (15000 I.E. Vit. A/kg; 600 I.E. Vit. D/kg; 75 mg Vit. E/kg); Altromin Spezialfutter GmbH & Co. KG, Lage, Deutschland) gehalten. Die Unterbringung erfolgte in den behördlich genehmigten Tierhaltungen der Neurochirurgischen Klinik bzw. des IBMI mit konstanter Temperatur von 20-24°C und Luftfeuchtigkeit von 45-60%. Die Einhaltung eines zwölfstündigen Tag/Nacht-Rhythmus der Beleuchtung wurde ebenfalls gewährleistet. Das Hygienemanagement der Tierhaltungen erfolgte gemäß den FELASA-Empfehlungen.

### 2.2 Narkose

Die Narkose der Versuchstiere erfolgte beim Modell der "Middle Cerebral Artery Occlusion" (MCAO) zur Auslösung eines ischämischen Schlaganfalls über eine Isofluran-Inhalationsanästhesie, während zur Induktion einer SAB mittels endoluminaler Perforation eine Kombinations-Injektionsanästhesie, bestehend aus Midazolam, Fentanyl und Medetomidin, verwendet wurde.

Die Anästhesie wurde bei der MCAO mittels Insufflation von 1,5 - 2% Isofluran (Isofluran, Abbott Arzneimittel GmbH, Hannover, Deutschland) bei 0,2 l O<sub>2</sub>/min und suffizienter Spontanatmung während der im Schnitt zehnmütigen Prozedur aufrechterhalten. Durch Abatmung des Narkotikums erwachten die Tiere komplikationslos aus der Narkose.

Die Auslösung einer SAB im hier vorgestellten Modell benötigte aufgrund umfangreicherer Vorbereitung mehr Zeit, weswegen die Narkose durch die intraperitoneale Injektion einer Dreifach-Kombination von Medikamenten in folgender Dosierung eingeleitet wurde: Midazolam 5mg/kg KG

(Midazolam-ratiopharm, ratiopharm GmbH, Ulm, Deutschland), Fentanyl 0,05mg/kg KG (Fentanyl-Janssen, Janssen-Cilag GmbH, Neuss, Deutschland) und Medetomidin 0,5mg/kg KG (Dorbene vet., Pfizer GmbH, Berlin, Deutschland). Danach erfolgte die Intubation unter dem Mikroskop (Olympus SZX7, Olympus Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland) mit einem Tubus, der einer modifizierten Venenverweilkanüle (Introcan Safety 20 G, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) entsprach (s. Abb. 2).



**Abbildung 2: Intubationstubus**

Die korrekte Lage des Tubus wurde mit Hilfe einer Mikrokapnographie (MicroCapnoGraph CI240, Columbus Instruments, Columbus, USA) überprüft, wobei eine deutliche CO<sub>2</sub>-Kurve des abgeatmeten CO<sub>2</sub> als Nachweis einer erfolgreichen Intubation diente. Daraufhin wurde das Versuchstier an einen Kleintierrespirator (MiniVent Type 845, Hugo Sachs Elektronik, March, Deutschland) bei einem Fluss von 0,1l/min und 100% O<sub>2</sub>-Zufuhr angeschlossen und durchgehend bis zum Ende der Operation beatmet. Die Narkosetiefe (Aufrechterhaltung des Stadiums der chirurgischen Toleranz) wurde durch regelmäßiges Kneifen der Zehenzwischenräume überprüft und bei Bedarf durch Nachinjektion von 1/4 der Anfangsdosis aufrechterhalten. Die Narkose wurde am Ende der Präparation mittels Antagonisierung durch nachfolgende Substanzen terminiert: Flumazenil 0,5mg/kg KG (Flumazenil Inresa, Inresa Arzneimittel GmbH, Freiburg, Deutschland), Naloxon 1,2mg/kg KG (Naloxon Inresa, Inresa Arzneimittel GmbH, Freiburg, Deutschland) und Atipamezol 2,5mg/kg KG (Alzane, Pfizer GmbH, Berlin, Deutschland).

### **2.3 Temperaturkontrolle**

Die Aufrechterhaltung einer konstanten Körpertemperatur von 37°C wurde in allen Versuchsreihen durch den Einsatz einer rektal eingeführten Temperatursonde (TC-1000 Temperature Controller, CWE Inc., Ardmore, USA) mittels aktiver Rückkoppelung durch eine Heizplatte gewährleistet. Im Anschluss an die Operation wurden alle Tiere zur postoperativen Temperaturkontrolle mindestens 2 Stunden in eine Wärmebox gesetzt und ihre Körpertemperatur währenddessen stündlich bestimmt. Vor Dekapitation aller Versuchstiere wurde ebenfalls noch einmal die Körpertemperatur bestimmt.

## 2.4 Körpergewicht

Als Anhaltspunkt für den Allgemeinzustand der Tiere diente das Körpergewicht, das vor jeder Prozedur und dann am Ende der Versuchsphase nach 24 h gemessen wurde. Der Ausschluss der Tiere erfolgte bei Gewichtsverlust von über 20% binnen eines Tages.

## 2.5 Induktion der Ischämie im MCAO-Modell

Nach erfolgreicher Einleitung der Narkose wurde das Versuchstier in Rückenlage gebracht und an den Extremitäten fixiert. Durch einen Hautschnitt über dem linken lateralen Halsdreieck kam die Gefäß-Nervenscheide des Halses zur Darstellung. Nach stumpfer Präparation der umliegenden Strukturen und vorsichtigem Abdrängen der V. jugularis interna und des N. vagus stellte sich die A. carotis communis mit ihren Abgängen dar.

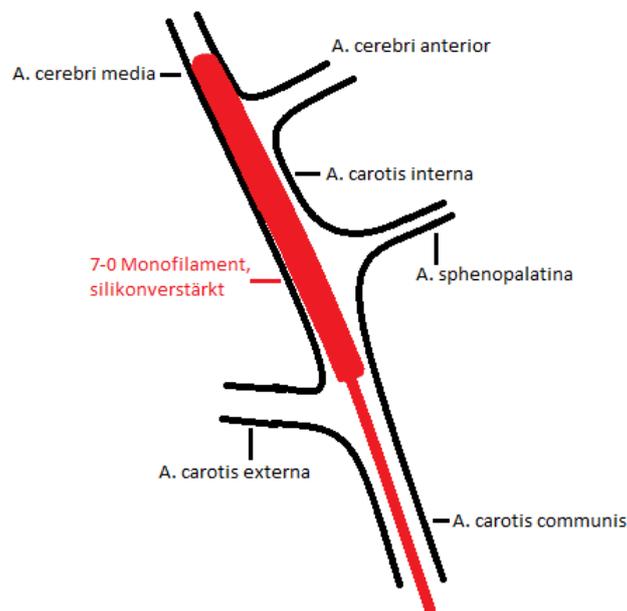


Abbildung 3: Schematische Darstellung des MCAO-Modells

Sowohl die A. carotis communis als auch die A. carotis externa wurden permanent ligiert. Danach wurde die A. carotis interna temporär mit einem Clip verschlossen. Dadurch wurde eine Blutleere für die nachfolgende Querinzidierung der A. carotis communis geschaffen. In bestehendem Schnitt wurde ein 1,2 cm langer monofiler, stumpfer Faden der Stärke 7.0 (Ethilon 7-0, Ethicon, Norderstedt, Deutschland), der mit einer Silikonschicht (Xantopren M mucosa/Activator Universal Plus, Heraeus Kulzer GmbH, Hanau, Deutschland) überzogen war, eingeführt. Nach Entfernung des Clips um die A. carotis interna wurde dieser Faden unter Sicht 1,0 cm in der A. carotis interna vorgeschoben und mit Hilfe einer vorgelegten Ligatur fixiert. Dadurch wurde ein Verschluss der A. cerebri media an ihrem Abgang an der Schädelbasis erreicht, was konsekutiv zur Ischämie des versorgten Areals führte. Nach einer Stunde Okklusion im Wachzustand wurde der Faden unter kurzer Re-Narkose wieder geborgen. Die Haut der Tiere wurde mit Vicryl 6-0 (Vicryl 6-0, Ethicon, Norderstedt, Deutschland) wieder

verschlossen. Postoperativ wurden noch 300 µl NaCl s.c. unterstützend als Flüssigkeitsreservoir gespritzt und die Tiere in eine Wärmebox zur halbstündlichen Temperaturkontrolle umgesetzt.

## 2.6 Das endoluminale Perforationsmodell der Subarachnoidalblutung

Das hier verwendete endoluminale Modell der Subarachnoidalblutung stellte eine Modifikation eines von Bederson et al. (Bederson, Germano et al. 1995) entwickelten Verfahrens dar. Als Erfolgskontrolle diente der schlagartige Anstieg des ICP, weswegen eine Hirndruckmessung unumgänglich war.

Daher wurde nach Intubation das Versuchstier in Bauchlage gebracht und die Haut am Schädel in der Verbindungslinie von Auge und Ohr rechtsseitig inzidiert. Nach stumpfem Abtrennen der Galea aponeurotica wurde der M. temporalis von der Crista supratemporalis abgetrennt und nach unten mobilisiert. Unter Zuhilfenahme eines Mikrobohrers (Proxxon Micromot 50/E, Proxxon GmbH, Niersbach, Deutschland) wurde unmittelbar unterhalb der Crista supratemporalis ein 0,2 mm großes Loch in den Schädel gebohrt, allerdings ohne die Dura zu perforieren. In diese Öffnung wurde eine ICP-Druckmesssonde mit Durchmesser 1,2 mm (Codman Microsensor Basic Kit, Codman, Norderstedt, Deutschland), die mit einer Messeinheit (ICP-Express, Codman, Norderstedt, Deutschland) verbunden war, eingebracht. Nach Prüfung des physiologischen ICP, der als Ausgangswert festgehalten wurde, fixierte man die Sonde epidural mit Zahnzement (Poly-F Plus Bondex, Dentsply DeTrey GmbH, Konstanz, Deutschland), um so einen Druckausgleich über die Trepanation zu verhindern.

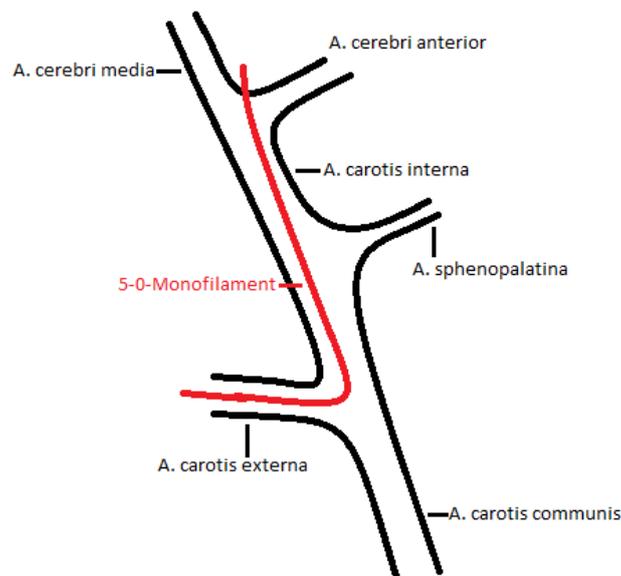


Abbildung 4: Schematische Darstellung des endoluminalen Perforationsmodells der SAB

Das Versuchstier wurde nun in Rückenlage gebracht und die Haut über dem linken lateralen Halsdreieck inzidiert. Analog zum MCAO-Modell wurde die Gefäß-Nervenscheide des Halses dargestellt und die A. carotis communis mit ihren Abgängen, der A. carotis externa und A. carotis

interna, dargestellt. Die A. carotis externa wurde stammfern ligiert, die A. carotis communis und die A. carotis interna temporär geclipt. Ein 3,0 cm langer, angespitzter, monofiler Faden der Stärke 5-0 (Prolene 5-0, Ethicon, Norderstedt, Deutschland) wurde nach Querinzision der A. carotis externa eingeführt und mit einer proximal davon gelegenen Ligatur in der A. carotis externa fixiert. Nach Freigabe des Blutflusses über die A. carotis communis durch Entfernung beider Clips wurde die A. carotis externa durchtrennt und der eingeführte Perforationsfaden in die A. carotis interna vorgeschoben. Unter visueller Kontrolle des ICP wurde der Faden weiter geschoben, bis es zum massiven Anstieg des Hirndrucks kam. Dessen Spitzendruck wurde ebenfalls notiert. Unmittelbar danach wurde der Faden zurückgezogen, die A. carotis externa mit der vorgelegten Ligatur verschlossen und der Blutfluss komplett freigegeben. Die Druckmesssonde wurde, nach letzter Messung des ICP, wieder in Bauchlage entfernt und sowohl die Trepanation als auch die Hautwunde mit Gewebekleber (Histoacryl, Braun Aesculap, Tuttlingen, Deutschland) verschlossen. Nach Antagonisierung der Narkose wurden die Versuchstiere zur postoperativen Analgesie mit Buprenorphin 0,15µg/kg KG s.c. (Temgesic, Reckitt Benckiser Healthcare Inc., Slough, UK) versorgt und in eine Wärmebox zur Temperaturkontrolle umgesetzt.

Zum Vergleich und um den Einfluss der Operationsmethode auf die Tiere abschätzen zu können, wurden Tiere SHAM-operiert. Die Prozedur verlief hierbei analog wie oben beschrieben, nur dass der Faden nicht bis zum Anstieg des intrazerebralen Drucks vorgeschoben wurde, sondern ohne eine Blutung auszulösen wieder zurückgezogen wurde. Das postoperative Regime unterschied sich nicht von den Tieren mit manifester SAB.

## 2.7 Aufbau der „Multi Spectral Optoacoustic Tomography“

Den technischen Aufbau des in den Versuchen verwendeten MSOT zeigt Abb. 5:

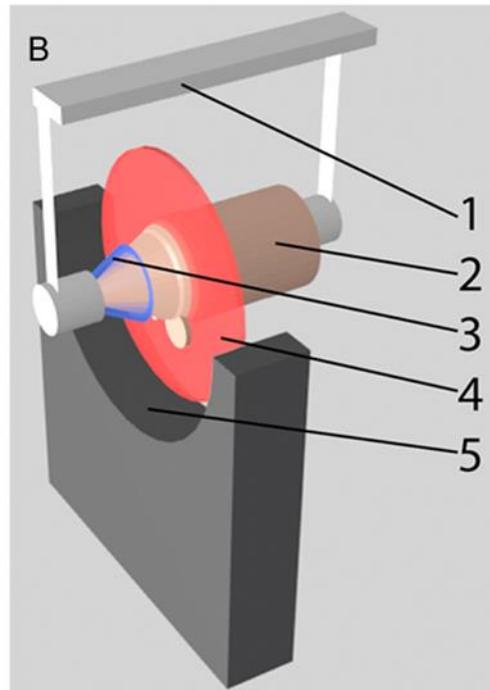


Abbildung 5: Schematischer Aufbau des MSOT: 1 Haltevorrichtung; 2 Versuchstier; 3 Narkosemaske; 4 Illuminationsebene; 5 Detektoranordnung (s. Fig. 1B, Kneipp et al.)

Dabei handelte es sich um ein Kleintier-MSOT. Zur Lichterzeugung diente ein Laser (Phocus, Opotek Inc., Carlsbad, USA), der die Generierung von Lichtpulsen unter 10 ns bei einer Wiederholungsfrequenz von 10 Hz ermöglicht, mit einer Wellenlängenbandbreite von 680-950nm und einer maximalen Pulsenergie von 120mJ bei 750nm, was den rechtlichen Vorgaben des Laserschutzes entspricht. Die induzierten Ultraschallwellen wurden von einer aus 64 bzw. 128 Elementen bestehenden Detektorbatterie (Imasonic SAS, Voray, Frankreich) registriert. Deren zylindrische Anordnung in einer 172° umfassenden Kreisebene und der Abstand von 40 mm zum Fokuspunkt erlaubte die Generierung zweidimensionaler Schnittbilder in Echtzeit.

Das Versuchstier wurde hierzu in Rückenlage an eine Narkosemaske angeschlossen, in einer horizontal verschiebbaren Halterung fixiert und mit einer Membran aus Polyethylen vom sich in der Messkammer befindlichen 34°C warmen Wasser abgeschirmt. Diese Anordnung erlaubte eine akustische Kopplung zwischen Versuchstier und den Ultraschall-Detektoren. Während der ganzen Untersuchung befand sich das Versuchstier in 2,0%-Isofluran-Narkose bei 0,8l O<sub>2</sub>/min.

Die in den Versuchen verwendeten 15 Wellenlängen erstreckten sich von 710nm auf 850nm. Der Abstand zwischen den einzelnen Schnittbildern betrug immer 500 µm, so dass zwischen 13 und 18 Ebenen pro Tier vermessen wurden.

Zusätzlich kam als Kontrastmittel im MSOT Indocyaningrün (ICG) (Absorptionsmaximum 800nm) zur Anwendung, dessen Verteilung und Kinetik im zerebralen Gefäßbett eine Abschätzung der

Perfusionsrate, sowohl während der Ischämie als auch nach der Subarachnoidalblutung, erlauben sollte. Dazu wurden den Tieren 25mmol/l ICG in 100µl NaCl verdünnt gespritzt.

### 2.7.1 Messungen im Modell des ischämischen Schlaganfalls

Im Zuge unserer Experimente wurden acht Tiere vor der Prozedur in oben beschriebenem MSOT als Referenz für die nachfolgende Ischämiebildung vermessen. Den vollständigen Ablauf der Versuche zeigt Abb. 6.

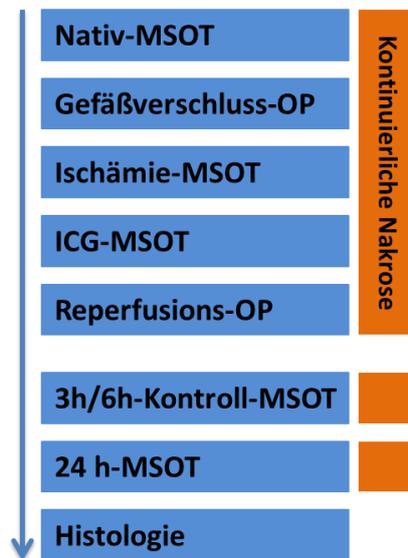


Abbildung 6: Ablauf der Messungen im MCAO-Modell

Vor der Operation wurde eine erste Messung im MSOT durchgeführt und den Versuchstieren ein Katheter zur i.v.-Applikation eines ICG-Bolus in die Schwanzvene gelegt. Unmittelbar nach erfolgreicher Platzierung des Fadens zur MCAO und Verschluss der Haut erfolgte die zweite Messung im MSOT. Daran schloss sich eine analoge Messung unter Gabe von ICG an. Daraufhin wurde das Filament entfernt und die Tiere wurden erweckt. Je nach Randomisierung erhielten die Versuchstiere eine Verlaufsmessung im Abstand von 3 oder 6 Stunden nach MCA-Verschluss. Nach 24 Stunden wurde ein Abschluss-MSOT durchgeführt, woraufhin sie getötet und bei den Tieren 1 und 2 der ganze Körper und bei den Tieren 3-8 nach Herauslösen deren Hirne in flüssigem Stickstoff konserviert wurden. Zwischen den Messungen wurden die Vitalparameter (Körpertemperatur, Atemfrequenz) und die Narkosetiefe der Tiere in regelmäßigem Abstand kontrolliert.

### 2.7.2 Messungen im endoluminalen Perforationsmodell der Subarachnoidalblutung

Die Bildung der Subarachnoidalblutung erfolgte an acht Tieren in einer ersten Versuchsreihe 24 Stunden nach Auslösen der Blutung jeweils nativ und nach ICG-Gabe. Bei weiteren acht Versuchstieren wurde analog zu den obigen Messungen zuerst ein Kontroll-MSOT durchgeführt, wie Abb. 7 verdeutlicht.

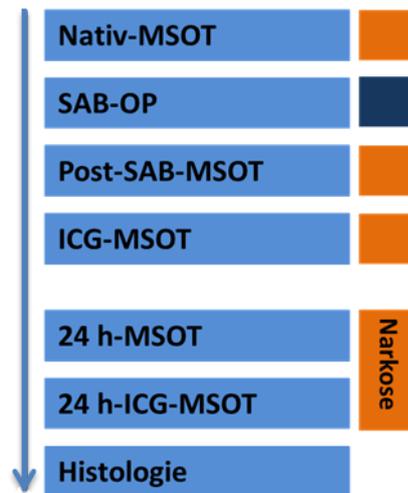


Abbildung 7: Ablauf der Messungen im endoluminalen Perforationsmodell der SAB

Dann wurde nach Legen eines i.v.-Katheters und dem Auslösen der Blutung, wie oben beschrieben, das Gehirn gescannt. Im Anschluss nach ICG-Gabe folgte ein weiteres MSOT, sowie nach 24 Stunden die Abschluss-Bildgebung. Unmittelbar danach wurde bei den ersten Tieren noch einmal der intrakranielle Druck bestimmt. Bei der zweiten Versuchsreihe wurde davon abgesehen, weil die Implantation der ICP-Sonde unter Sicht, histologisch validiert, einen zu großen Kollateralschaden verursachte. Anschließend wurden die Tiere getötet und im Ganzen in flüssigem Stickstoff eingefroren. Während der Experimente erfolgte die regelmäßige Kontrolle der Vitalparameter analog zum MCAO-Modell. Bei den ersten Versuchen wurden ein MSOT-Gerät mit einer 64 Elemente umfassenden Detektoranlage eingesetzt, bei der zweiten Versuchsreihe hingegen eines mit 128 Elementen. Alle Messungen im MSOT wurden unter 2,0%-Isoflurannarkose bei 0,8l/min O<sub>2</sub> durchgeführt, wohingegen die Auslösung der Blutung unter oben beschriebener Intraperitonealnarkose erfolgte. Aus diesem Grund musste das Narkoseregime zwei Mal, wenn auch ohne Unterbrechung der Anästhesie, geändert werden.

## 2.8 Bildrekonstruktion

Nach Gewinnung vorläufiger Datensätze aus dem MSOT wurden die Bilder durch die am Projekt beteiligten Mitarbeiter des IBMI, Moritz Kneipp und Jake Turner, rekonstruiert. Die gesamte Bildanalyse im Rahmen dieser Arbeit ist Teil separater Dissertationen Moritz Kneipps und Jake Turners. Einerseits erfolgte die Rekonstruktion nach dem Verfahren der „filtered backprojection“, das vor allem in der Computertomographie große Anwendung findet. Dabei leitet man zur genaueren Darstellung einer Schnittebene des zu untersuchenden Objekts dessen Signal im Tomographen aus mehreren zueinander versetzten Projektionen ab, wie Abb. 8 illustriert. Die Darstellung der exakten Struktur wird durch eine dichotome Filterung der ankommenden Signale gewährleistet, was die Auflösung bzw. Trennschärfe erhöht.

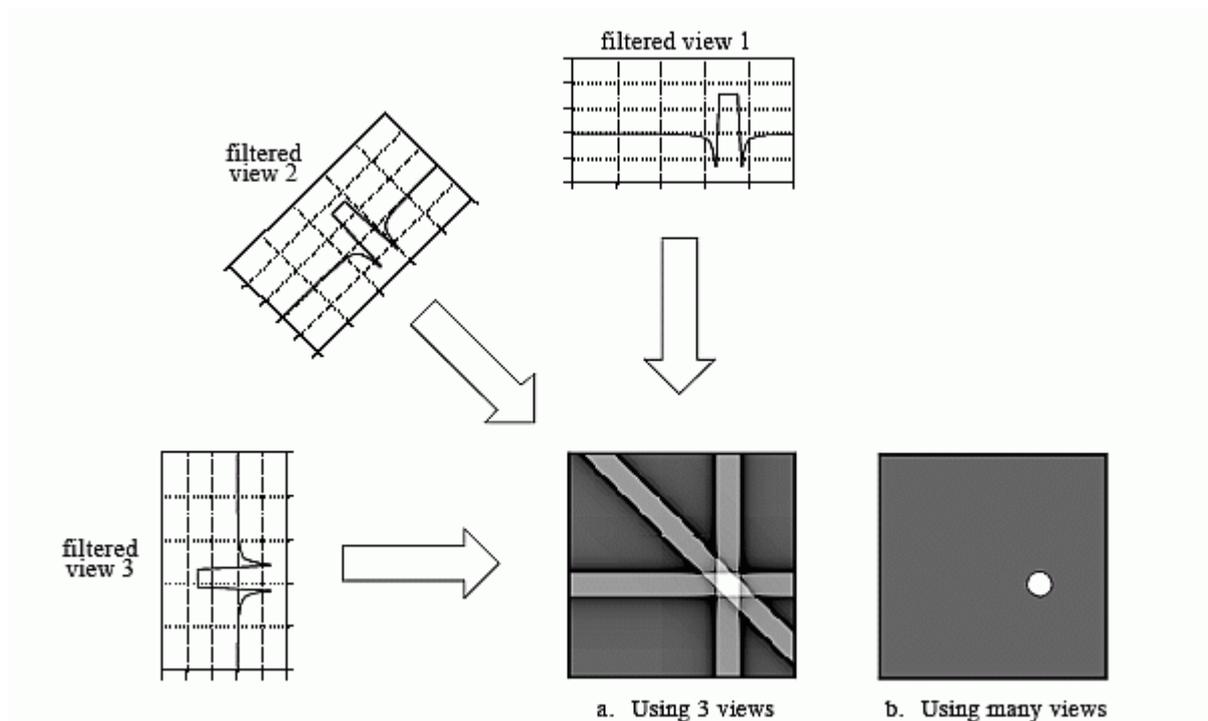


Abbildung 8: Schematische Darstellung der "filtered backprojection"-Technik; mod. nach "The Scientist and Engineer's Guide to Digital Signal Processing"

Zur genaueren Verarbeitung der Datensätze wurden zeitintensivere Rekonstruktionen mittels „model-based reconstructions“ erstellt. Diese Methode ermöglicht es, den optischen Fluss im Medium sowie die Detektorgeometrie und das volumetrische Absorptionsverhalten zu berücksichtigen. Diese Rekonstruktionen liefern unter Rücksichtnahme auf die in Kapitel 1.7.2 geschilderten physikalischen Eigenschaften ein exakteres Abbild der tatsächlichen Verhältnisse im Mausgehirn.

Die Referenz aller Bilder stellt der Scan bei einer Wellenlänge von 790nm dar. Dies entspricht dem isosbestischen Punkt des Hämoglobins, d.h. der Wellenlänge, bei der die Absorptionskoeffizienten von deoxygeniertem und oxygeniertem Hämoglobin gleich sind. Aufbauend auf einer homogenen Anregung und den Streuungseigenschaften des Gewebes kommt es vor allem aufgrund der starken Absorptionseigenschaften des Hämoglobins zur Ableitung eines detektierbaren Signals. Daher handelt es sich eigentlich eher um ein vaskuläres Signal und nicht um ein rein anatomisches, zelluläres Abbild der Gewebestruktur. Da aber zur Aufrechterhaltung des zerebralen Metabolismus ein ausreichender Blutfluss, also eine homogene Hämoglobinverteilung, vorhanden sein muss, kann dieses Signal als Referenz herangezogen werden. Einschränkend sei gesagt, dass mittels Erfassung des Hämoglobins nur die korpuskulären Anteile des Blutes erfasst werden können, der Hämatokrit also mit berücksichtigt werden muss. Die Messung bei 790nm repräsentiert folgerichtig auch das zerebrale Blutvolumen (cerebral blood volume, CBV), also die totale Hämoglobinkonzentration im jeweiligen Schnittbild. Aufbauend darauf erfolgt die Aufschlüsselung nach Biomarkern, die mit Hilfe

der Absorptionsspektren von oxygeniertem und deoxygeniertem Hämoglobin und der multispektralen Datensätze Rückschlüsse auf den Sauerstoffgehalt in den Gefäßen erlaubt.

Diese Spektralanalysen wurden farbkodiert in allen Schnittebenen über die Referenzmessung bei 790nm gelegt, so dass sich qualitative, subjektiv bewertbare Bilder daraus ableiten lassen. Um jedoch quantitative, vergleichbare Daten zu generieren, wurde in den Scans der MCAO-Versuchsreihe die Region-of-Interest (ROI)-Methode angewandt. Hierbei beschränkten wir uns, im Gegensatz zur flächigen Abbildung des gesamten Gehirns, auf zwei jeweils definierte korrespondierende Punkte in linker und rechter Hemisphäre, sowohl im Kortex als auch im Striatum. Diese Punkte wurden aufgrund morphologisch eindeutig zuordenbarer Hirnareale zu den drei Messzeitpunkten in den 790nm- Scans aller acht Tiere ausgewählt und die Signalintensitäten beider Hemisphären in das Verhältnis gesetzt.

## 2.9 Histologische Auswertung

In allen Versuchen folgte die routinemäßige Aufbereitung der Gehirne als Histologie. Mit Hilfe eines Cryomikrotoms (Leica CM 1950, Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland) wurden Gefrierschnitte aller Versuchstiere angefertigt und mit HE gefärbt. Hierzu vielen Dank an Florian Jurgeleit (MTA) vom IBMI, der uns bei den Schnitten unterstützt hat.

Die Proben aus den Messungen zum ischämischen Schlaganfall wurden mit der Schichtdicke von 10µm im Abstand von jeweils 500 µm auf Objektträger übertragen. Im Anschluss an eine HE-Färbung erfolgte eine Quantifizierung des endgültigen Infarktolumens mit Hilfe eines Durchlichtmikroskops und einer Messsoftware. Hierzu wurden alle Objektträger einzeln hinsichtlich der sichtbaren Infarktgröße vermessen und die einzelnen Infarktflächen unter Berücksichtigung der Schichtdicke mit Hilfe von Microsoft Excel zum Gesamtinfarktolumen aufaddiert. Diesbezüglich vielen Dank an Irina Eskina (MTA) vom Lehrstuhl für Experimentelle Neurochirurgie am Klinikum rechts der Isar.

Von den Tieren der Experimente zur Subarachnoidalblutung wurden Schnitte von jeweils 30µm alle 300µm genommen. Bevor man die jeweiligen Schnitte auf einen Objektträger übertrug, wurden mit einem speziell gefertigten Kamerasystem Farbbilder unter Normallicht und im Fluoreszenzmodus (Anregung: 740 nm, Detektion: 800 nm) aufgenommen. Die Schnitte wurden im Anschluss mit HE gefärbt.

## 2.10 Applikation von Oxycyte® nach Subarachnoidalblutung

Bei den Versuchen konnten drei Versuchsgruppen unterschieden werden. Bei der ersten Gruppe handelte es sich um SHAM-Tiere, die nach der OP für 24 h in eine Wärmebox mit Raumluft gesetzt wurden. Die zweite Gruppe umfasste die operierten Kontrolltiere, denen unmittelbar nach der Blutung 240µl NaCl über die Schwanzvene injiziert wurden. Diese Tiere wurden ebenfalls für 24 h in einer Wärmebox bei Raumluft gehalten. Und als dritte Gruppe gab es die Tiere mit

Subarachnoidalblutung, die nach der Blutung 240µl Oxycyte<sup>®</sup> i.v. in einer Konzentration von 6g/kg KG erhielten und dann 24 h in einer abgedichteten Wärmebox bei 100%-O<sub>2</sub>-Sättigung verbrachten. Währenddessen hatten alle Tiere freien Zugang zu Wasser und Nahrung. Die Bereitstellung der Injektionen erfolgte randomisiert und verblindet für den Operateur, so dass letztendlich 52 über einen Zeitraum von zwei Monaten operierte Tiere gleichmäßig verteilt auf die drei Gruppen in die Auswertung eingeschlossen wurden.

Bei Oxycyte<sup>®</sup> handelt es sich um ein ringförmiges Perfluorocarbon, des Perfluoro-t-butylcyclohexan in einer 60%igen Emulsion mit Eiphospholipiden.

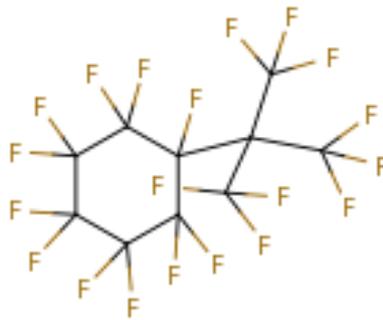


Abbildung 9: Perfluoro-t-butylcyclohexan-Strukturformel; mod. nach [www.synquestlabs.com](http://www.synquestlabs.com)

## 2.11 Neurologische Testung nach Subarachnoidalblutung

Bei den 24 h nach SAB-Induktion durchgeführten Tests handelte es sich um die Modifikation einer Verhaltenstestbatterie nach Chen et al. (Chen, Li et al. 2001), die verschiedene motorische und sensorische Parameter erfasste und so die Neurophysiologie der Versuchstiere objektiviert, wie Tabelle 2 illustriert.

**Tabelle 2: Neurologische Testbatterie (mod. nach Chen et al.)**

Art des Tests	Punkte
<b>Ausmaß der Hemiparese</b>	
Fehlende Streckung der Vorderpfote	1
Fehlende Streckung der Hinterpfote	1
Fehlendes Heben des Kopfes > 10° binnen 30 s	1
<b>Gangtest</b>	
Normaler Gang	0
Unsicherer Gang (Breites Gangbild)	1
Kreiseln	2
Keine Bewegung	3
<b>Koordination: Beam Walk Test</b>	
Sicheres Balancieren	0
Festklammern am Stab	1
Abrutschen mit einer Extremität	2
Abrutschen mit zwei Extremitäten oder Kreiseln um den Stab	3
Versuch nicht abzurutschen > 30 s	4
Versuch nicht abzurutschen > 20 s	5
Versuch nicht abzurutschen < 10s	6
<b>Sensorik</b>	
Corneal-Reflex nicht auslösbar	1
Pinna-Reflex nicht auslösbar	1

Bei der ersten Aufgabe wurde das Tier an seinem Schwanz in geringer Höhe über den Boden gehalten. Neurologisch unbeeinträchtigte Mäuse versuchten durch Ausstrecken der Extremitäten

und Absenken des Kopfes das Aufsetzen auf dem Boden zu antizipieren, wohingegen Versuchstiere mit Vigilanzeinschränkung oder sensomotorischem Defizit das nicht vermochten.

Die zweite Aufgabe umfasste das Gangverhalten auf einer ebenen Fläche, das in Relation zum Normalbefund beurteilt wurde.

Als dritte Aufgabe zur Überprüfung komplexer Bewegungsabläufe und Koordination diente der „Beam Walk Test“, bei dem die Tiere in einer Höhe von ca. 30 cm auf einem runden, mit Heftpflaster beklebten Stab balancieren mussten. Je nach neurologischer Beeinträchtigung gelang es dem Versuchstier, sich normal auf dem Stab fortzubewegen bzw. sich für die Zeitdauer von mindestens 30s auf dem Stab zu halten.

Zum Schluss dienten die Auslösbarkeit des Korneal-Reflexes und des Pinna-Reflexes (Kopfschütteln auf taktilen Reiz im äußeren Gehörgang) zur Evaluation sensorischer Verschaltungen.

Diese Teste sollten bei einer erreichbaren Gesamtpunktzahl von 14 Punkten der Stratifizierung des Schweregrads der globalen neurologischen Beeinträchtigung dienen. Hierzu erfolgte die Einteilung in drei Untergruppen: Mildem Schadensprofil entsprachen 1-5 Punkte, mittlerem Schadensprofil 6-10 Punkte und schwerem Schadensprofil 11-14 Punkte.

## **2.12 Hirnwassergehaltmessung nach Oxycyte®-Applikation**

Zur Objektivierung des durch eine SAB induzierten Schadens hat sich, wie bereits von Feiler et al. gezeigt (Feiler, Friedrich et al. 2010), die Bestimmung des Hirnwassergehalts als verlässlicher und geeigneter Parameter erwiesen. Das durch die Subarachnoidalblutung induzierte Hirnödem erlaubt es, in Zusammenschau mit den neurologischen Tests das Ausmaß der SAB zu quantifizieren.

Dazu wurden die Tiere 24 h nach der Blutung dekapitiert. Das Riechhirn und das Kleinhirn wurden abgetrennt, die Hemisphären geteilt und deren Nassgewicht jeweils separat bestimmt. Nach 24 h bei 110 °C im Trocknungsschrank (APT.line FD23, Binder GmbH, Tuttingen, Deutschland) wurde erneut das Gewicht der Hemisphären gemessen und nach der Formel (Nassgewicht-Trockengewicht/Nassgewicht) der prozentuale Hirnwassergehalt berechnet.

## **2.13 Statistische Auswertung**

Zur Beurteilung der Daten wurden Varianzanalysen für unverbundene Stichproben durchgeführt. Die Nullhypothese, das heißt kein statistisch nachweisbarer Unterschied der untersuchten Daten, wurde mit einer Fehlerwahrscheinlichkeit von unter 5% abgelehnt. Mit Hilfe der Programme Excel 2010 (Microsoft GmbH, Unterschleißheim, Deutschland) und SigmaStat 3.5 (Systat Software GmbH, Erkrath, Deutschland) wurde die Statistik für diese Arbeit durchgeführt. Die Graphiken wurden mit SigmaPlot 11.0 (Systat Software GmbH, Erkrath, Deutschland) erstellt. Sofern nicht anders gekennzeichnet sind alle Ergebnisse als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung angegeben. Für den Vergleich der CBV-Ratios der ROI-Analyse der MCAO-Bildgebungsstudie verwendeten wir aufgrund

nicht normalverteilter Daten den Friedman-Test und haben die Ergebnisse in Form von Boxplots graphisch dargestellt. Die Bestimmung der Mortalitätsrate und des prozentualen Hirnwassergehalts in den Versuchen mit Oxycyte erfolgte ebenfalls nicht-parametrisch, weswegen diese Daten ebenfalls als Boxplots dargestellt sind. Demgegenüber wurden die Ergebnisse der neurologischen Testung zu Subklassen zusammengefasst und in prozentualen Anteilen dargestellt.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 MSOT-Bildgebung: Ischämischer Schlaganfall

In der in-vivo Studie zum ischämischen Schlaganfall wurden insgesamt acht Tiere untersucht. Ein Tier schied aufgrund eines fehlenden Infarkts aus der Wertung aus. Die empirisch erhobenen Rahmendaten der untersuchten Tiere zeigt Tabelle 3. Auch wenn die histologisch gesicherte Infarktgröße als primärer Endpunkt im Mittel nur  $66 \text{ mm}^3$  beträgt und damit unter den in Vergleichsstudien mindestens gemessenen  $90 \text{ mm}^3$  liegt (Standard operating procedures (SOP) in experimental stroke research: SOP for middle cerebral artery occlusion in the mouse), liegt die Standardabweichung mit  $\pm 25 \text{ mm}^3$  im dort geforderten Rahmen, um eine zulässige Homogenität der untersuchten Gruppe vorauszusetzen.

**Tabelle 3: Zusammenfassung der Versuchsreihe im MCAO-Modell des ischämischen Schlaganfalls**

	Maus 1	Maus 2	Maus 3	Maus 4	Maus 5	Maus 6	Maus 7	Maus 8
Anzahl der Scans	5	5	4	5	5	4	5	5
Kumulierte Narkosezeit	3 h 10 min	2 h 35 min	3 h 00 min	2 h 40 min	2 h 10 min	2 h 40 min	2 h 55 min	2 h 50 min
OP-Zeit	55 min	10 min	30 min	20 min	15 min	20 min	30 min	20 min
Scan-Zeit	20 min	20 min	20 min	20 min	20 min	20 min	20 min	20 min
Infarktgröße (Histologisch gesichert)	Kein Infarkt	36 $\text{mm}^3$	55 $\text{mm}^3$	69 $\text{mm}^3$	39 $\text{mm}^3$	88 $\text{mm}^3$	73 $\text{mm}^3$	104 $\text{mm}^3$

#### 3.1.1 Morphologische Bildgebung im MCAO-Modell

Abb. 10 zeigt eine repräsentative Schnittebene im Scan vor Ischämie mit dazu korrespondierender Histologie nach Ischämie (mod. nach Abb. 2a aus Publikation Kneipp et al., die Teil dieser Arbeit ist (Kneipp, Turner et al. 2014)). Diese Schnittebene ist im Gehirn weiter kaudal gelegen, so dass neben dem Kortex bereits Anschnitte des Mittelhirns mit dem periäquadrakalen Grau und der Formatio reticularis als Teil des Hirnstamms zu sehen sind. In den in den MCAO-Versuchen rekonstruierten Bildern entspricht die linke Hemisphäre des Tieres der rechten Seite des Bildes, wie durch die korrespondierende Histologie mit linkszerebralem Infarkt illustriert. In dem bei 790nm rekonstruierten Bild lässt sich die Struktur des Gehirns in Ultraschallqualität ableiten. Die Wellenlänge 790nm entspricht dem isosbestischen Punkt, also der Wellenlänge, bei der sich die Absorptionskoeffizienten von oxygeniertem und deoxygeniertem Hämoglobin entsprechen. Dadurch kommt es zu keiner Gewichtung des Signals basierend auf der Oxygenierung des Gewebes, sondern zur Darstellung der totalen Hämoglobinkonzentration. Deswegen repräsentiert diese Rekonstruktion

das vaskuläre Hintergrundsignal und somit wie in Kap. 2.8 ausgeführt die beste Näherung an die reelle Morphologie des Gehirns.

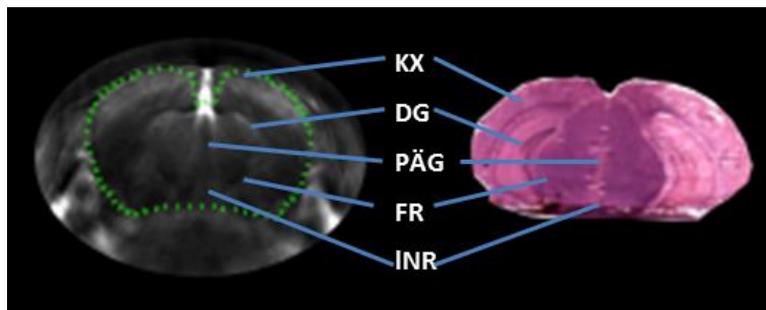


Abbildung 10: MCAO-Vergleich: MSOT-Schnittbild Maus 6, Slide 12 und Histologie (KX = Kortex; DG = Gyrus dentatus; PÄG = periäquadales Grau; FR = Formatio reticularis; INR = linearer rostraler Nukleus), mod. nach Kneipp et al.

Allerdings war die morphologische Zuordnung im prä-ischämischen Nativbild nicht in allen Messungen so eindeutig, wie Abb. 11 illustriert. Die Schnittebenen entsprechen denen von Abb. 10. Die Aussagekraft der Scans war von Tier zu Tier sehr unterschiedlich. Während in Maus 4 eine Zuordnung zwischen MSOT und postmortaler Histologie in der unversehrten rechten Hemisphäre vorstellbar ist (s. Pfeil), fällt dies bei den Tieren 3 und 5 schwerer.

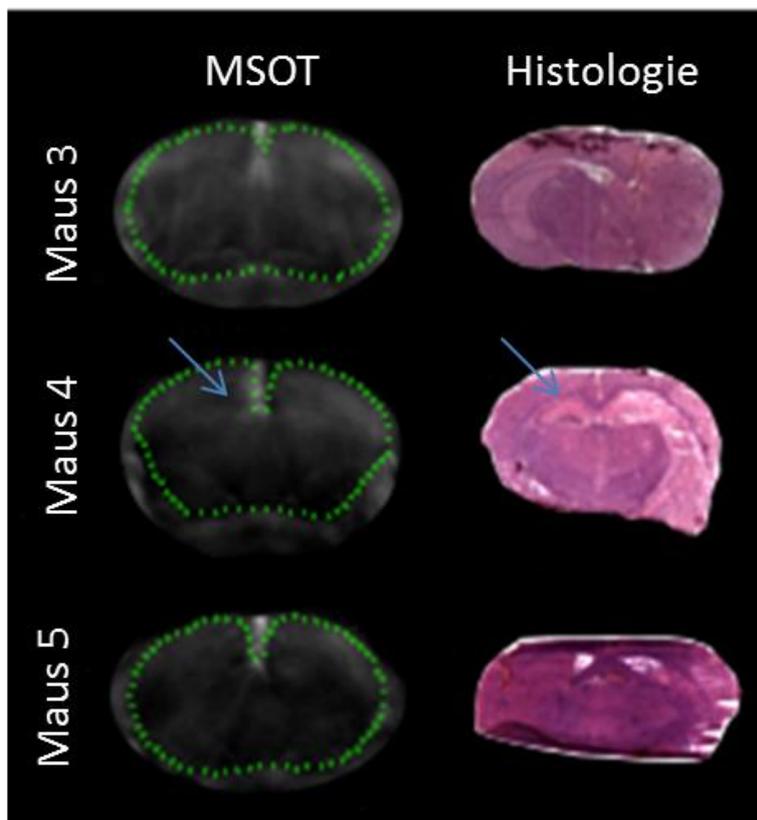


Abbildung 11: MCAO-Vergleich: MSOT-Schnittbilder mit Histologie in den Tieren 3, 4 und 5

Die nach Ischämie unter ICG-Gabe durchgeführten Messungen erbrachten keinen Mehrwert an Bildinformation, weder zur Kontrastverstärkung noch zur genaueren Perfusionsabschätzung, wie an

Abb. 12 ersichtlich wird. Hierbei handelt es sich um die gleiche Schnittebene wie Abb. 10. Aus diesem Grund wurden die ICG-verstärkten Bilder in die weitere Auswertung nicht mit eingeschlossen.

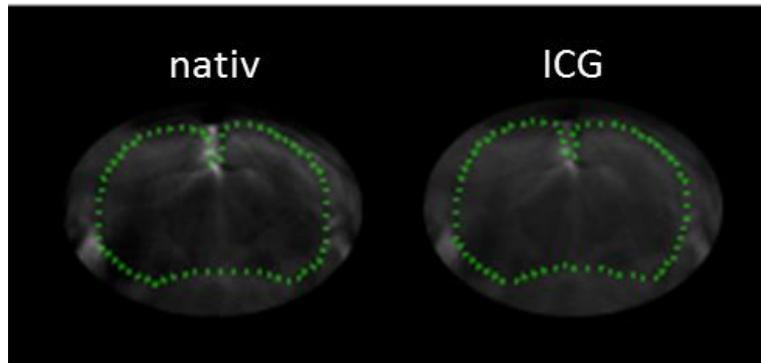


Abbildung 12: MCAO-Vergleich: MSOT nativ mit MSOT nach ICG-Gabe (Maus 6, Slide 12)

### 3.1.2 Funktionelle Bildgebung im MCAO-Modell

Abb. 13 (mod. nach Abb. 2b aus Publikation Kneipp et al., die Teil dieser Arbeit ist (Kneipp, Turner et al. 2014)) zeigt die zu Abb. 10 passende Spektroskopie, die aufbauend auf den Absorptionseigenschaften des Hämoglobins bei verschiedenen Wellenlängen im Nah-Infrarot-Bereich die Sauerstoffsättigung des Gewebes darstellt. Blau eingefärbte Areale entsprechen deoxygeniertem Hämoglobin, währenddessen rote Gebiete höhere Sauerstoffspannungen repräsentieren.

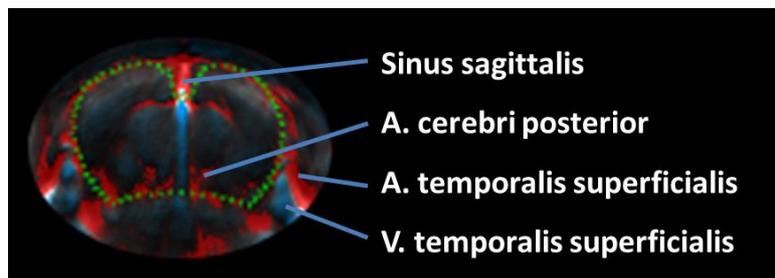


Abbildung 13: Hämoglobin-Spektroskopie (Maus 6, Slide 12)

Einschränkend sei aber festgehalten, dass es sich hierbei nicht um quantitative Werte handelt. Denn je nach Festlegung des Schwellwerts unterscheiden sich die Farbintensitäten, sodass ein Vergleich der Absolutwerte der Oxygenierung zwischen den Tieren nicht zulässig ist. Allerdings lässt sich ein Muster durch alle Tiere ableiten, wie exemplarisch Abb. 13 zeigt. Die großen extra- und intrakraniellen Gefäße lassen sich deutlich abgrenzen. Außerdem fällt im nativen Scan eine Symmetrie zwischen den Hemisphären, ebenso wie ein homogenes Verteilungsmuster des DeOxy-Hämoglobin-Signals im Parenchym auf. Das wiederum kann als eine gleichmäßige Perfusion bei homogener Sauerstoffextraktionsrate im Gehirn interpretiert werden. Dieser Sachverhalt findet sich durchweg in allen Schnittebenen bei allen ausgewerteten Tieren.

Abb. 14 (mod. nach Abb. 2c aus Publikation Kneipp et al., die Teil dieser Arbeit ist (Kneipp, Turner et al. 2014)) zeigt eine repräsentative vollständige prä-/postoperative Tomographie einer Maus. Beginnend links oben auf Höhe der rostralen Großhirnhemisphären bis hin zum Hirnstamm sind

Schnittbildebene im Abstand von 1 mm gezeigt. Dabei zeigt sich neben der Formveränderung des Gehirns deutlich eine Symmetrie im Scan vor der Ischämie, versinnbildlicht durch die homogene Sauerstoffverteilung in der Spektroskopie. Das starke Signal des oxygenierten Hämoglobins in den extrakraniellen und pialen Gefäßen erlaubt allerdings keine gute Differenzierbarkeit im Parenchym, weswegen die folgenden Spektroskopien rein auf Grundlage des DeOxy-Signals ausgeführt wurden. Im 24 h-Scan sieht man eine Signalerhöhung linkshemisphärisch (s. Pfeile) in den zentralen Schnitten, die dem Versorgungsgebiet der A. cerebri media entsprechen. Dieses Signalverhalten kann im Sinne einer erhöhten Sauerstoffextraktion im Vergleich zur Gegenseite in diesen Arealen nach Gefäßverschluss gesehen werden.

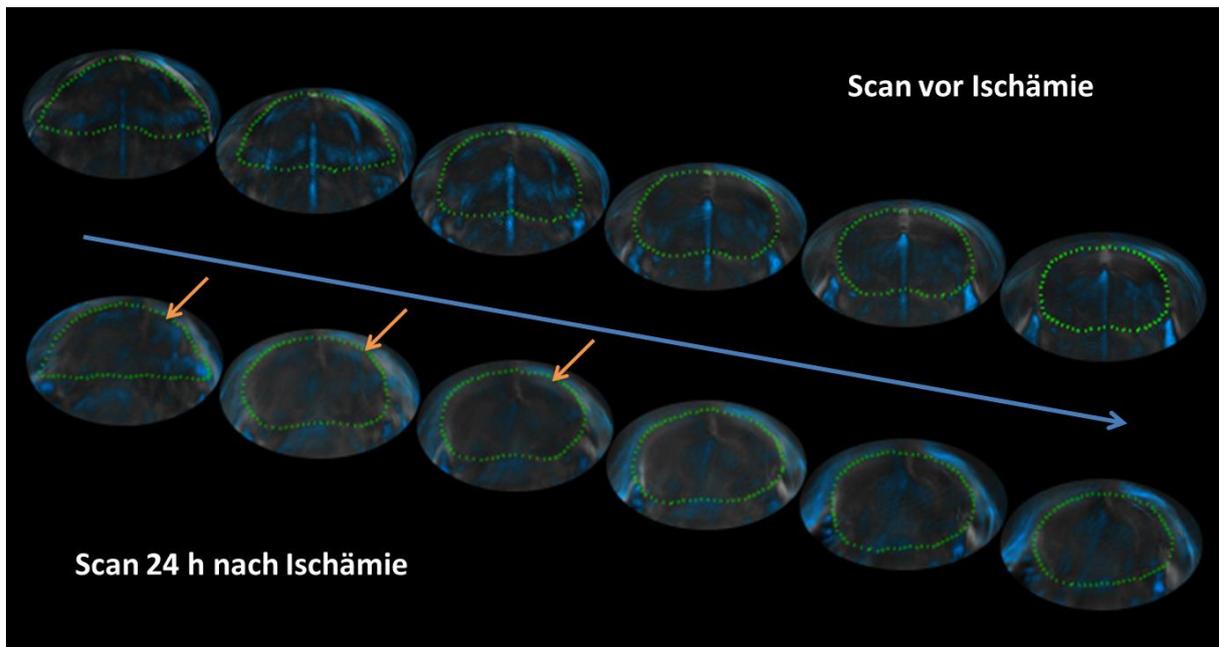


Abbildung 14: Vergleichende prä-/postoperative Tomographie Maus 7; mod. nach Kneipp et al.

Dass es sich hierbei nicht um einen zufälligen Befund bzw. ein Artefakt handelt sieht man in Abb. 15 (= mod. nach Abb. 3 aus Publikation Kneipp et al., die Teil dieser Arbeit ist (Kneipp, Turner et al. 2014)). Anhand dreier exemplarischer Tiere lassen sich mehrere Feststellungen treffen. In allen Scans vor Ischämie ist eine klare Symmetrie des DeOxy-Signals beider Hemisphären auszumachen. Dieser Zustand ist während der Ischämie vollkommen aufgehoben. Obwohl sich die Veränderungen im Signalverhalten nicht in allen drei Tieren exakt gleichen, kommt es doch unstrittig zur Umverteilung des DeOxy-Signals im ischämisch kompromittierten Hirn. Dass diese Veränderungen nicht nur temporärer Natur sind, verdeutlicht der 24h-Scan, in dem diese Muster, wenn auch in attenuierter Form, noch deutlich zu erkennen sind.

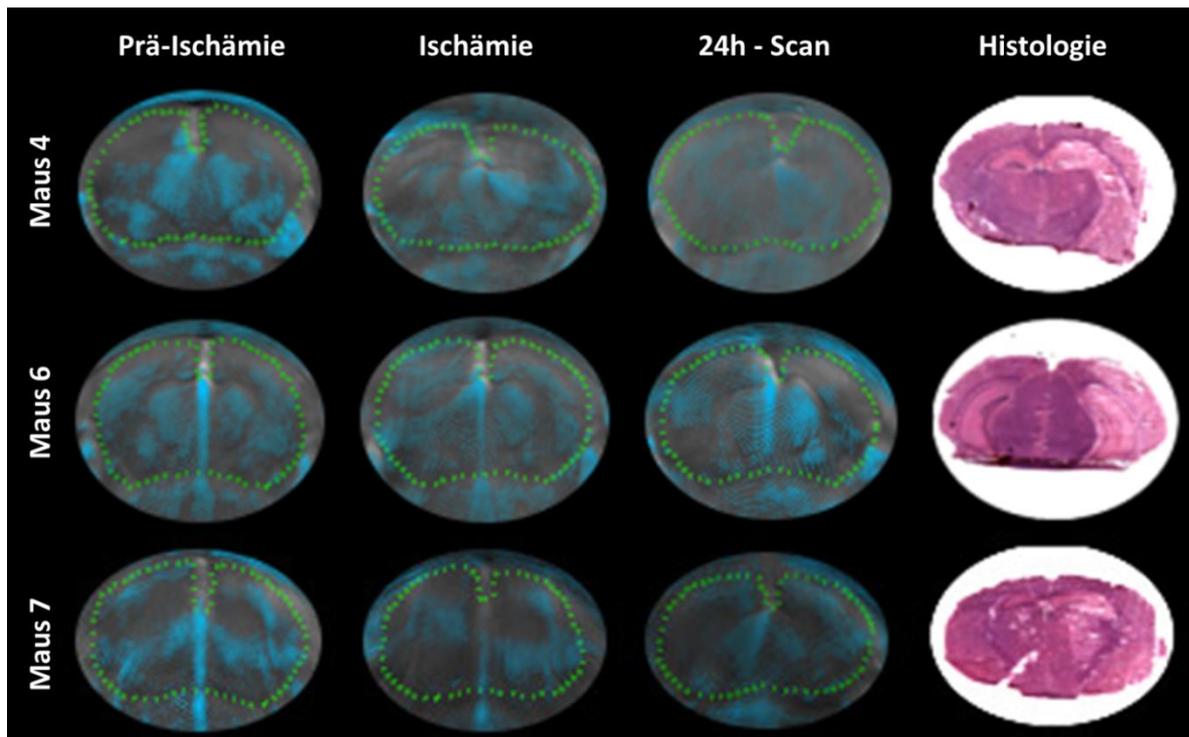


Abbildung 15: MCAO-Vergleich: Zeitlicher Verlauf der DeOxy-Hämoglobinspektroskopie dreier Tiere; mod. nach Kneipp et al.

Aufgrund des Fehlens absoluter Referenzwerte ist eine Vergleichbarkeit zwischen den Tieren nicht möglich. Daher wurde eine Analyse der Seitenverhältnisse in ausgewählten Arealen durchgeführt und dadurch die Gesamtanalyse über alle Tiere ermöglicht. So zeigt Abb. 16 (mod. nach Abb. 4 aus Publikation Kneipp et al., die Teil dieser Arbeit ist (Kneipp, Turner et al. 2014)) ergänzend einen Interhemisphärenvergleich absoluter Absorptionen aller Tiere für ausgewählte Messpunkte im Kortex und im Striatum. Hierdurch können nun Änderungen der Blutvolumenverteilung in der nicht perfundierten Hemisphäre relativ zur Gegenseite im Verlauf nachvollzogen werden, wodurch sich die Änderung des totalen zerebralen korpuskulären Blutvolumens in allen Tieren nachweisen lässt. Die Bilder repräsentieren wiederum die Absorption des Hämoglobins bei 790 nm, was dem isosbestischen Punkt entspricht.

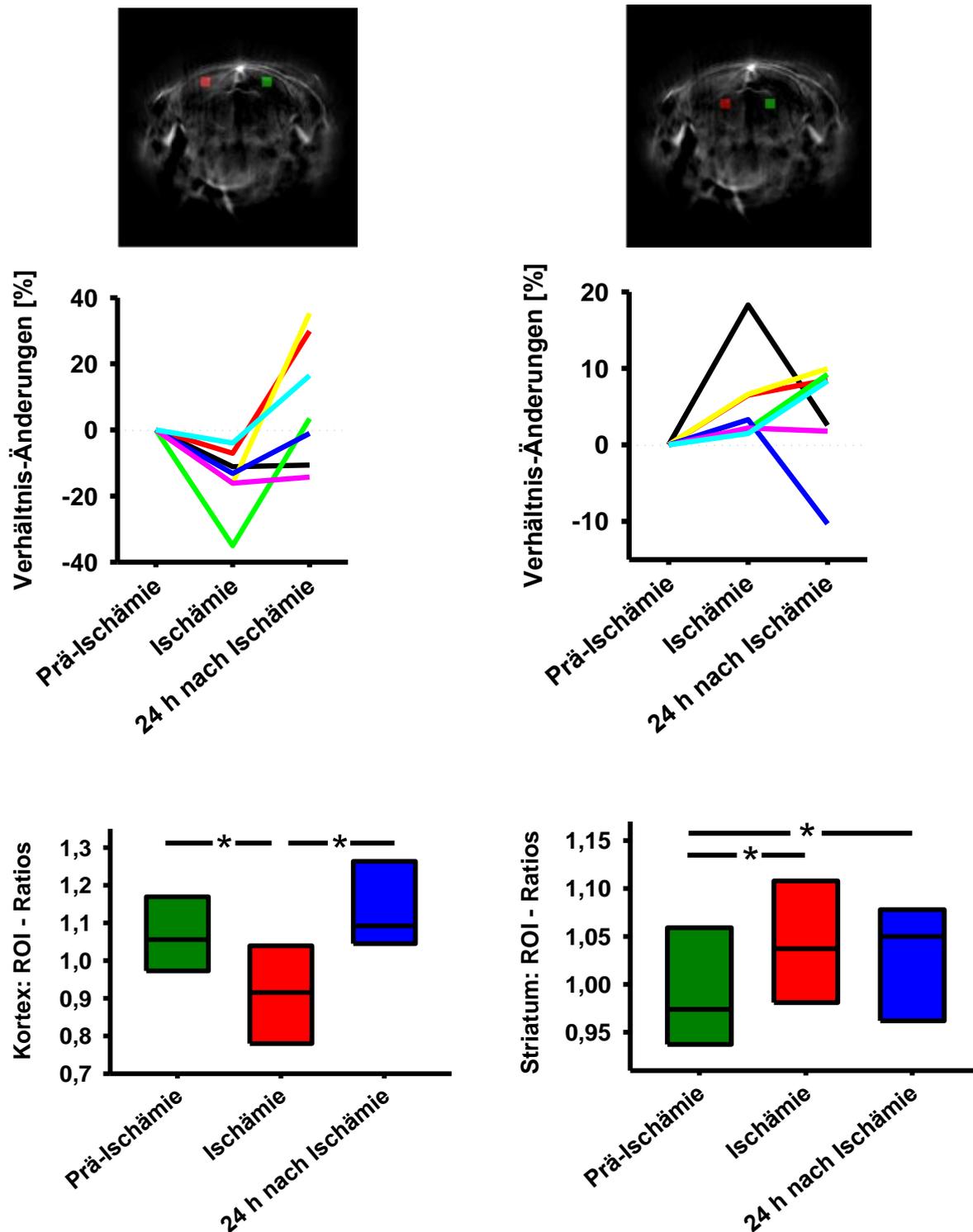


Abbildung 16: MCAO-Vergleich: Blutvolumenverhältnisse aller Tiere im Verlauf; mod. nach Kneipp et al.

Bezogen auf das totale CBV zeigen sich deutliche Unterschiede. Wie aus den linksseitigen Teilen der Graphik ersichtlich wird, ist im Kortex während der Ischämie in allen Tieren eine deutliche Abnahme des zerebralen Blutvolumens linkshemisphärisch im Vergleich zur Gegenseite zu beobachten. Durch Aufarbeitung der Daten in Form eines Boxplots wird deutlich: Der Median der ROI-Ratios befindet sich vor der Ischämie näherungsweise beim Wert 1, die totale Hämoglobinkonzentration ist an

beiden Messpunkten gleich. Dieser Quotient verschiebt sich während der Ischämie zuungunsten der linken Hemisphäre, weswegen der Wert auf 0,9 abfällt, um dann nach Reperfusion kompensatorisch über das Ausgangsniveau anzusteigen. Wie die Abbildung ebenfalls zeigt, sind die Messwerte, versinnbildlicht durch die Quartilen und die fehlenden Ausreisser, symmetrisch verteilt, so dass die Signifikanz dieser Ergebnisse in allen Tieren nachgewiesen ist. Daraus lässt sich der Nachweis einer erfolgreichen Okklusion der A. cerebri media ableiten.

Im Striatum verhält es sich anders, wie der rechte Teil der Abbildung illustriert: Während der Okklusion der MCA ist prozentual in beiden Messpunkten in allen Tieren eine Hyperämie zu verzeichnen. Aufgetragen in Form eines Boxplots zeigen sich auch hier Änderungen der Mediane der ROI-Ratios der totalen Hämoglobinkonzentration, wenn auch in geringerem Ausmaß als im Kortex. Eine Signifikanz lässt sich aus diesem Grund nur zwischen dem Ausgangswert und den jeweiligen Werten des CBV in der Ischämie und 24 h nach Okklusion nachweisen, jedoch nicht untereinander. Nichtsdestoweniger steigt während der Ischämie der Wert für den Median der ROI-Ratios signifikant an und kehrt auch nach Reperfusion nicht auf den Ausgangswert zurück.

### 3.2 MSOT-Bildgebung: Subarachnoidalblutung

In zwei aufeinanderfolgenden Versuchsreihen wurden insgesamt 16 Tiere eingeschlossen. Bei den ersten Experimenten wurden die Mäuse (n=8) lediglich exakt 24 Stunden nach Auslösung der Blutung vermessen. Es existieren also keine Vergleichsdaten im Sinne eines Scans vor Blutung, es wurden jedoch zwei SHAM-operierte Tiere als Referenz mit ausgewertet. Ein Tier verstarb vor Beginn der Messungen, weswegen es nicht in die Auswertung eingeschlossen wurde. Die empirisch erhobenen Daten dieser Messungen zeigt Tabelle 4. In der ersten Zeile der Tabelle sind der anfangs gemessene ICP, der Spitzenhirndruck und der Druck bei Abschluss der Operation aufgeführt. Der intrakranielle Spitzendruck beträgt bei den Tieren mit Blutung im Mittel  $90 \pm 39$  mmHg, ist also starken Schwankungen zwischen den Tieren unterworfen.

**Tabelle 4: Zusammenfassung der ersten Versuchsreihe SAB**

	Maus 9	Maus 10	Maus 11	Maus 12	Maus 13	Maus SHAM 1	Maus SHAM 2
ICP-Verlauf	6/109/17 mmHg	8/73/22 mmHg	8/126/22 mmHg	8/26/13 mmHg	6/71/14 mmHg	7/7/7 mmHg	6/6/6 mmHg
ICP nach 24 h	17 mmHg	24 mmHg	16 mmHg	17 mmHg	16 mmHg	7 mmHg	12 mmHg

#### 3.2.1 Morphologische Bildgebung bei der Subarachnoidalblutung

Abb. 17 zeigt ein repräsentatives Beispiel eines Schnittbilds im MSOT 24 Stunden nach Subarachnoidalblutung. Wie in den oben gezeigten Bildern nach MCAO-Verschluss sind die großen

Blutleiter des Gehirns zu erkennen. Allerdings ist die Auflösung des MSOTs zu gering, um das subarachnoidale Blut eindeutig identifizieren zu können, oder um volumetrische Messungen über das Ausmaß des subarachnoidalen Blutes durchzuführen. Auffällig ist eine prominente linksparietale Signalanhebung (s. Pfeil), die auf die Implantation der Druckmesssonde zurückzuführen ist, welche zu einem Gewebeschaden führt, der mit der Messung interferieren kann.

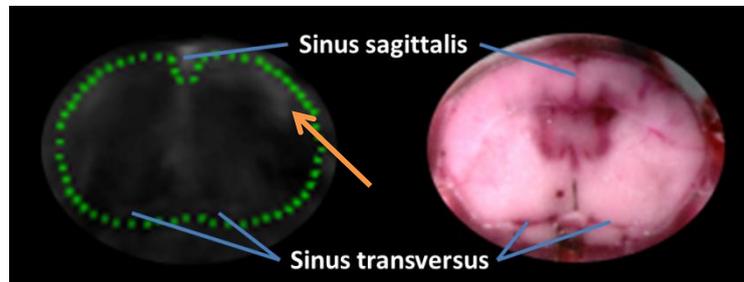


Abbildung 17: SAB-Vergleich: MSOT-Schnittbild Maus 10, Slide 10 mit Histologie

Analog zu den Versuchen im MCAO-Modell erbrachten die ICG-gestützten Messungen keinen höheren Bildkontrast und damit keinen diagnostischen Mehrwert, wie die zu Abb. 17 korrespondierende Schnittebene in Abb. 18 zeigt.

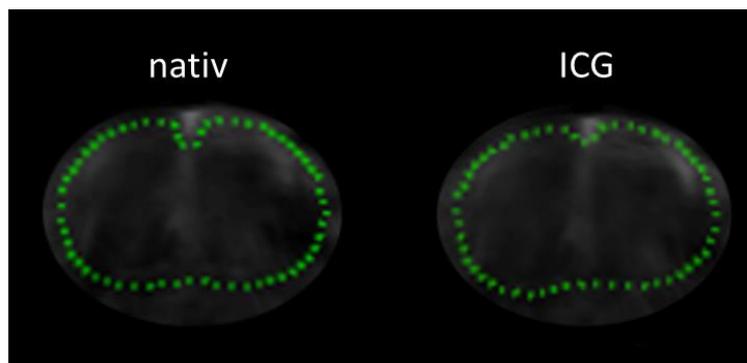


Abbildung 18: SAB-Vergleich: MSOT nativ mit MSOT nach ICG-Gabe (Maus 10, Slide 10)

### 3.2.2 Funktionelle Bildgebung bei der Subarachnoidalblutung

Abb. 19 zeigt wiederum eine Spektroskopie mehrerer Tiere der ersten Versuchsreihe, also 24 h nach der Blutung. Vorab ist zu erwähnen, dass die ausgeprägten Hämatome in der Histologie auf das Wiedereinführen der Druckmesssonde unter Sicht nach der Bildgebung zurückzuführen sind und aller Wahrscheinlichkeit nach nicht der in-vivo Situation der Messung entsprechen. Während das Oxy-Hämoglobin-Signal (rot) aufgrund der linksseitigen Wunde extrakraniell sehr intensiv abzuleiten ist und als der Einfluss des Gewebeschadens gelten muss, erscheint das Parenchym in der DeOxy-Signalspektroskopie in den Tieren mit SAB aufgelockert und inhomogen, unabhängig von der Hemisphäre (s. Pfeile). Da die globalen Auswirkungen der Blutung nach 24 h nicht strikt einer Gehirnregion zuzuordnen sind, erscheint diese Asymmetrie im MSOT-Bild möglich. Im Gegensatz dazu wirkt die Signalverteilung im SHAM-Tier etwas symmetrischer. Allerdings sind wie bereits in der Ischämie-

Bildgebung keine absoluten Werte ableitbar und damit die Tiere quantitativ nicht miteinander zu vergleichen.

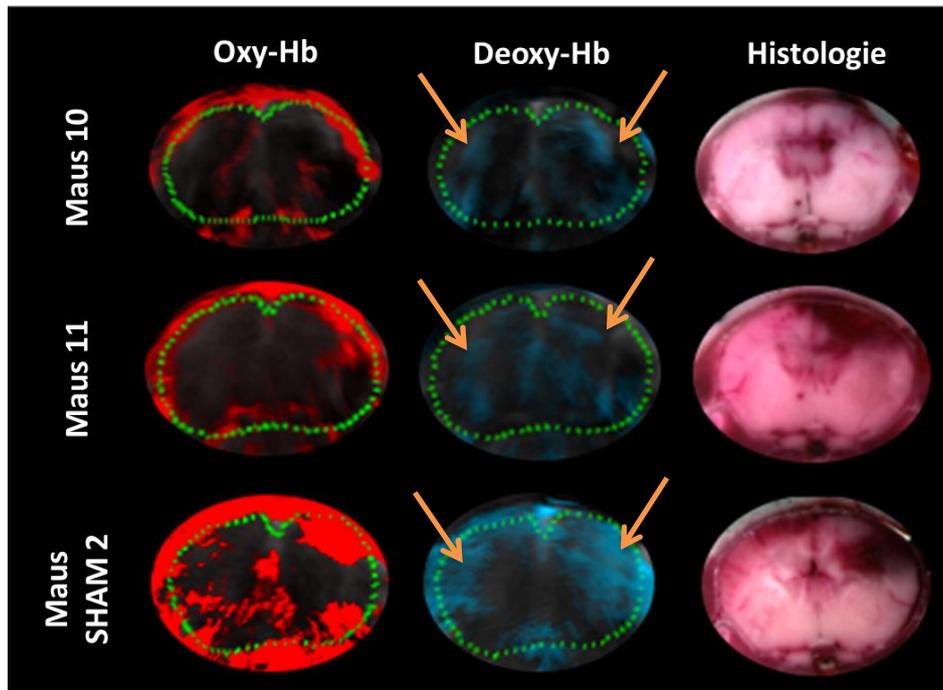


Abbildung 19: SAB-Vergleich: Spektroskopie 24 h nach Blutung mit Histologie

Aus diesem Grund haben wir in einer weitere acht Tiere umfassenden Messreihe in Analogie zu der Ischämie-Bildgebung eine präoperative Referenzmessung durchgeführt, sodass individuelle Vergleichsdaten für jedes Tier vorliegen, wie Tab. 5 zu entnehmen ist. Auch wurde zur Verbesserung der Auflösung eine 128 Elemente umfassende Ultraschalldetektorbatterie verwendet. Keines der Tiere überlebte 24 Stunden.

Tabelle 5: Zusammenfassung der zweiten Versuchsreihe

	Maus 14	Maus 15	Maus 16	Maus 17	Maus 18	Maus 19	Maus 20	Maus SHAM 3
Anzahl Scans	3	3	4	3	3	3	4	5
ICP-Verlauf	31/46/41 mmHg	27/36/32 mmHg	14/42/22 mmHg	7/70/19 mmHg	7/107/29 mmHg	10/72/16 mmHg	7/31/8 mmHg	4/4/3 mmHg

Hier zeigt sich mit einem Mittelwert von  $57 \pm 27$  mmHg erneut eine große Streuung der intrakraniellen Druckwerte. Unter Berücksichtigung der kleinen Tierzahl und der Komplexität der Operation ist eine gewisse Inhomogenität allerdings nicht zu vermeiden.

Abb. 20 zeigt exemplarisch zu den Messungen der zweiten Versuchsreihe rekonstruierte Bilder.

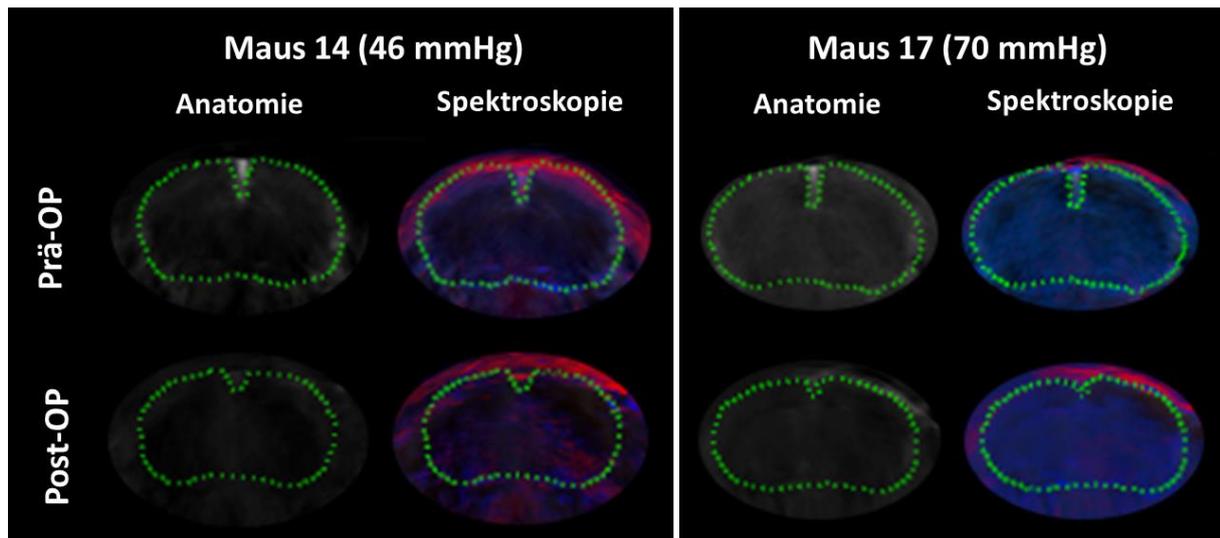


Abbildung 20: SAB-Vergleich: Prä-/postoperative MSOT-Bilder der zweiten Versuchsreihe

Die Gegenüberstellung vergleichbarer Schnittebenen zweier Tiere mit unterschiedlichem intrakraniellen Spitzendruck ist stellvertretend für die gesamte Serie, inklusive dem SHAM-Tier. Grundsätzlich ist festzuhalten, dass sich die Bilder vor und nach der Blutung nicht signifikant unterscheiden. Es finden sich keine Hinweise auf unmittelbar nach SAB bestehende Hypoperfusionen, zumindest nicht in der hier verwendeten MSOT-Anwendung. Nachdem alle Tiere über Nacht verstorben sind, existieren keine 24h - Daten, sodass auch keine Aussage zu Hypoperfusionen im weiteren Verlauf gemacht werden kann.

### 3.3 Therapiestudie mit Oxycyte®

#### 3.3.1 Intrakranielle Druckverteilung

Um die Effekte der Applikation eines Perfluorocarbons nach einer Subarachnoidalblutung beurteilen zu können, bedarf es einer guten Standardisierung der Ausgangsbedingungen. Im Mittel lag der Hirndruck bei den mit Oxycyte® behandelten Tieren bei  $67 \pm 22$  mmHg. Im Vergleich dazu lagen die Werte in der Vehikelgruppe bei  $66 \pm 18$  mmHg. Die Höhe des ICP nach Auslösen der Blutung korreliert mit dem Ausmaß der Schädigung des Gehirns, womit die Schwere der Subarachnoidalblutungen in beiden Gruppen vergleichbar ist. Damit ist gewährleistet, dass ein möglicher therapeutischer Effekt des Perfluorocarbons nicht durch Vorselektion verfälscht wird. Bei den SHAM-operierten Tieren war der ICP  $13 \pm 4$  mmHg, also etwas höher als der in anderen Studien gemessene physiologische ICP. Dieser Sachverhalt kann der Größe der verwendeten Druckmesssonde zugeschrieben werden.

#### 3.3.2 Mortalitätsrate

Analog zur Subarachnoidalblutung im Menschen ist die Mortalitätsrate des hier verwendeten Modells über alle operierten Tiere mit 33% hoch. Vergleichbare Studien haben ähnliche Werte

gezeigt. Aufgeschlüsselt nach Prozeduren ergibt sich ein differenzierteres Bild, wie Abbildung 21 zeigt.

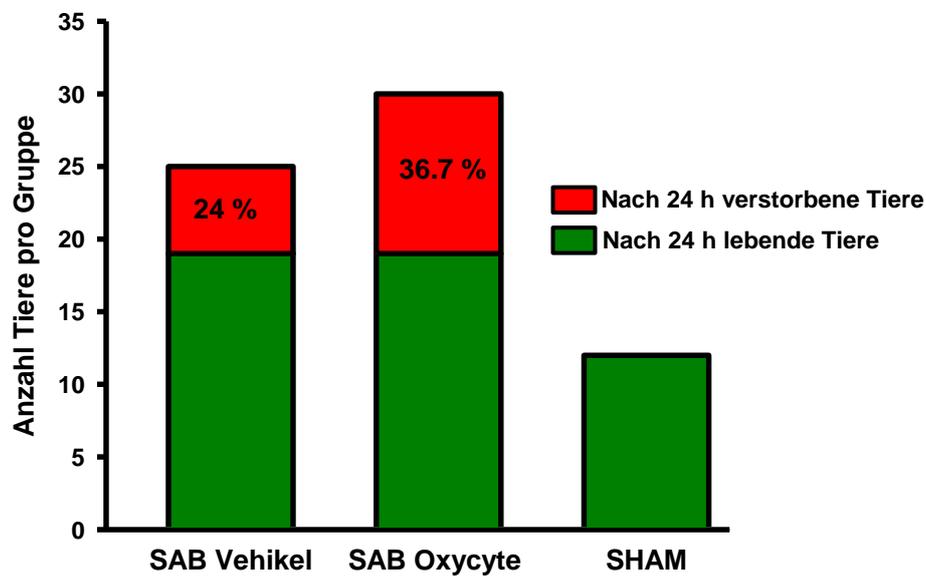


Abbildung 21: Oxycyte<sup>®</sup>-Pilotstudie: Vergleich der Mortalitätsraten

Wie zu erwarten ist von den SHAM-operierten Tieren keines verstorben. Von 25 operierten und mit NaCl behandelten Tieren sind 6 Mäuse, also 24 % im Zuge der Operation verstorben. Bei der Oxycyte<sup>®</sup>-Gruppe mit einer Ausfallsrate von nahezu 37 % waren 30 Tiere zu operieren, um auf eine identische Kohortengröße von  $n = 19$  zwischen Vehikel- und Oxycyte<sup>®</sup>-Gruppe zu kommen. Die Behandlung mit Oxycyte<sup>®</sup> in der Konzentration von 6g/kg KG und der Zufuhr von 100% Sauerstoff über 24 h bei ansonsten gleichen Ausgangsbedingungen im Vergleich zur Gabe von 240µl NaCl und 24h Raumluft führt binnen eines Tages zu einer erhöhten Sterblichkeit.

### 3.3.3 Hirnwassergehalt

Als zusätzlicher objektiver Parameter dient der Hirnwassergehalt als Indikator für das durch die SAB ausgelöste Hirnödem.

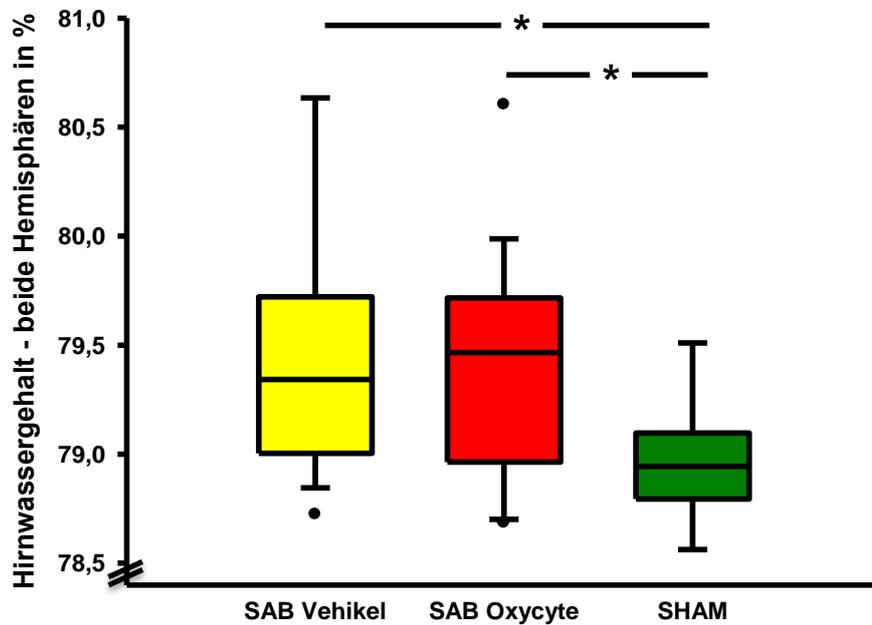


Abbildung 22: Oxycyte<sup>®</sup>-Pilotstudie: Vergleich des Hirnwassergehalts

Wie Abb. 22 zu entnehmen ist zeigt sich bei der Gegenüberstellung der Mediane des prozentualen Hirnwassergehalts beider Hemisphären eine Signifikanz im Unterschied von SHAM mit 78,94% zu den operierten Tieren. Innerhalb der Tiere mit SAB gibt es keinen signifikanten Unterschied im Hirnödem zwischen 79,34% in der Vehikelgruppe und 79,46% in der Oxycyte<sup>®</sup>-Gruppe. Die Gabe eines standardisierten Volumens Perfluoro-tert-Butylcyclohexan bewirkt im Vergleich zur Verabreichung der gleichen Menge physiologischer Kochsalzlösung 24 h nach Subarachnoidalblutung keinen geringeren Anstieg des Hirnwassergehalts.

### 3.3.4 Neurologische Testung

Zur Testung der funktionellen Einschränkungen nach Applikation von Oxycyte<sup>®</sup> unmittelbar nach einer Subarachnoidalblutung wurden die Tiere in verschiedenen Bereichen nach 24 h untersucht. Die Auswertung verdeutlicht Abb. 23:

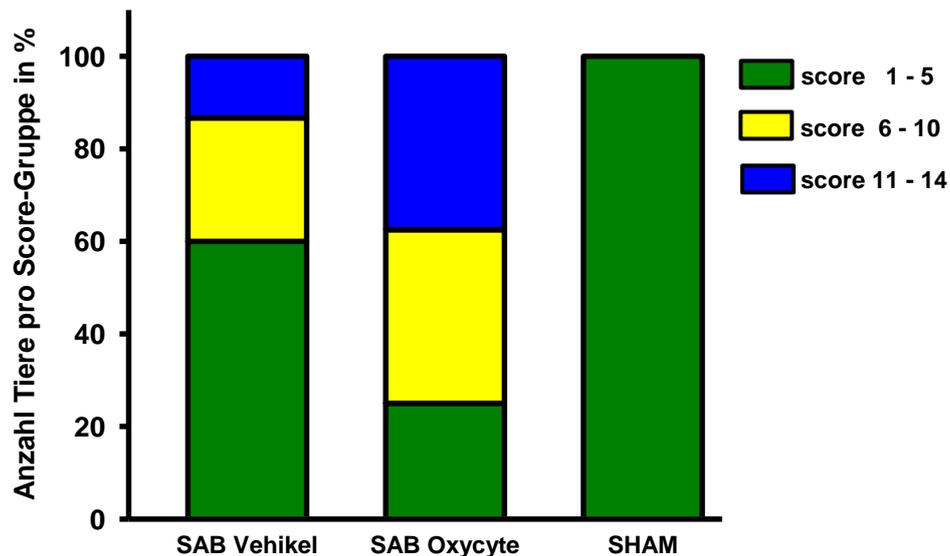


Abbildung 23: Oxycyte<sup>®</sup>-Pilotstudie: Vergleich der Schweregrade in der neurologischen Testung

Die Einteilung erfolgte gemäß einer Subgruppierung nach Schweregraden, wobei ein Score von 1-5 nur leichte Defizite versinnbildlicht. Ein Score von 6-10 repräsentiert eine mittelstarke Schädigung und ein Score von 11-14 impliziert schwerste funktionelle Ausfälle. Die SHAM-Tiere zeigen ausnahmslos ein durch das operative Vorgehen selbst ausgelöstes mildes Schadensprofil. Die anderen beiden Gruppen bieten im Vergleich dazu ein inhomogeneres Bild. Den weitaus größten Anteil an den schwer betroffenen Tieren hat die Oxycyte<sup>®</sup>-Versuchsgruppe mit 37,5% aller untersuchten Tiere. Demgegenüber stehen nur 13% schwer beeinträchtigte Tiere in der Vehikelgruppe. Also lässt sich vermuten, dass die Gabe von Oxycyte<sup>®</sup> in unseren Versuchen einen negativen Einfluss auf das funktionelle Outcome nach SAB binnen 24 h hat.

## 4 Diskussion

### 4.1 Methoden

#### 4.1.1 Auswahl der Versuchstiere

Die Erforschung zerebrovaskulärer Erkrankungen erfolgte im Tierexperiment in den letzten Jahren vor allem an Nagetieren. Dies ist darauf zurückzuführen, dass sich pathophysiologische Vorgänge in Nagern aufgrund ihrer phylogenetisch relativ engen Verwandtschaft gut mit denen höherer Säugetiere vergleichen lassen. Natürlich bleibt dabei zu berücksichtigen, dass das Gehirn von Ratten und Mäusen nicht so komplex wie das des Menschen aufgebaut ist und sich auch die Gefäßarchitektur unterscheidet. Nichtsdestoweniger bieten diese Tiere aufgrund ihrer durch Zucht erworbenen genetischen Homogenität und der Möglichkeit der Einflussnahme durch transgene und Knock-out-Verfahren auf Genexpressionsmuster eine stabile Grundlage für reproduzierbare und vor allem vergleichbare Ergebnisse. In unseren Studien sind vor allem C57/Bl6-Mäuse als Versuchstiere zum Einsatz gekommen, mit denen man in vielen Laboren weltweit große Erfahrung hat sammeln können.

Experimente im MSOT sind mit diesen Tieren jedoch nicht möglich. Das Fell der Tiere verursacht Interferenzphänomene bei der Signaldetektion, weswegen die Artefaktüberlagerung zu groß wäre, um verwertbare Bilder zu erhalten. Aus diesem Grund benötigt man entweder haarlose oder nackte Tiere. Bei Verwendung von Tieren der Nacktmaus-Linien, die aufgrund eines Gendefekts neben dem Ausbleiben der Körperbehaarung auch eine fehlende Entwicklung des Thymus aufweisen, stellt sich jedoch wegen der reduzierten Immunkompetenz das Problem einer veränderten Pathophysiologie mit erhöhter Sterblichkeit im endoluminalen Perforationsmodell der SAB dar, die bei gesunden C57/Bl6-Tieren mit 30% bereits sehr hoch ist. Zur Erhebung aussagekräftiger und vergleichbarer Langzeitdaten bedarf es also immunkompetenter, haarloser Mäuse. Diese Eigenschaften vereinen die Crl:SKH-1<sup>Hhr</sup>-Mäuse, die aus diesen Gründen in allen MSOT-Experimenten eingesetzt wurden. Eine Vergleichbarkeit mit dem Standardmodell der C57/Bl6-Mäuse und somit den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen ist insofern zulässig, weil sie sich in unseren Versuchen nicht wesentlich hinsichtlich ICP oder mittlerem Infarkt volumen von anderen Mausstämmen unterscheiden.

#### 4.1.2 Wahl der Narkose

Die am häufigsten im experimentellen Tiermodell eingesetzte Narkose ist aufgrund der geringen benötigten Applikationsmenge bei guter Analgesie und Hypnosewirkung eine Kombination aus Ketamin und Xylazin. Allerdings ist die Steuerbarkeit aufgrund der fehlenden Antagonisierbarkeit und der langen Nachschlafzeiten eingeschränkt. Zudem weist Ketamin als zentraler NMDA-Rezeptorantagonist relevante neuroprotektive Eigenschaften auf (Prass and Dirnagl 1998). Deswegen

ist dieses Narkoseverfahren für die hier bearbeitete Fragestellung ungeeignet. Als Alternative hierzu bieten sich aufgrund der kurzen Halbwertszeiten Inhalationsanästhetika an. Ohne die Notwendigkeit einer Injektion oder Intubation kommt es zu einer raschen Einleitung der Narkose und durch Abatmung der Gase zum raschen Sistieren der narkotischen Wirkung. Jedoch ist zu bedenken, dass Inhalationsanästhetika einen vasodilatativen Effekt auf alle Blutgefäße aufweisen, sodass es neben einem Abfall des systemischen Blutdrucks auch zu einem Anstieg der zerebralen Durchblutung kommt. Dieser Effekt wird bei spontan atmenden Mäusen noch durch eine erhöhte arterielle CO<sub>2</sub>-Spannung durch eine narkoseinduzierte Hypoventilation verstärkt. Dieses hämodynamische Ungleichgewicht haben wir durch die Beatmung mit 100% Sauerstoff und die damit verbundene zerebrale Vasokonstriktion auszugleichen versucht. Ergänzend dazu hat Isofluran im Vergleich zu anderen volatilen Narkotika eine Erhöhung des kortikalen Blutflusses in Kombination mit den geringsten Blutdruckschwankungen im Langzeitverlauf zur Folge (Janssen, De Celle et al. 2004). Vor dem Hintergrund des relativ geringen Operationsrisikos und der Vermeidung weiterer invasiver Maßnahmen wurden alle Prozeduren im Zusammenhang mit dem ischämischen Schlaganfall unter 2% Isofluran-Narkose bei spontan atmenden Tieren vollzogen.

Die grundlegend länger veranschlagte Operationszeit bei der Subarachnoidalblutung erforderte ein anderes Narkoseregime. Die intraperitoneale Injektionsanästhesie durch Dreifach-Kombination aus Midazolam, Fentanyl und Medetomidin erlaubt durch seine Antagonisierbarkeit eine gute Steuerung und besitzt bis dato keine nachgewiesenen neuroprotektiven Eigenschaften. Allerdings benötigt man aufgrund der atemdepressiven Wirkung des Fentanyls im Gegensatz zur Isoflurannarkose eine Intubation und ein Monitoring der Beatmung. Dies ist mit Hilfe eines Kleintierrespirators und einer Mikrokapnographie sichergestellt worden, sodass die damit gemessenen Vitalparameter stets im physiologischen Rahmen lagen. Einschränkend ist jedoch festzuhalten, dass aufgrund einer Limitation der Messvorrichtung in den MSOT-Versuchen keine künstliche Beatmung möglich war und daher für die Bildgebung auf eine 2%-Isofluran-Narkose gewechselt werden musste. Demzufolge kam es in kurzer Zeit zu zwei abrupten Wechseln der Anästhesie sowie zu einer längeren Narkosezeit vor und direkt nach der SAB, was unserer Ansicht nach mitverantwortlich für die hohe Mortalität in der zweiten SAB-Versuchsreihe war.

#### **4.1.3 Das Middle-cerebral-artery-occlusion (MCAO)-Modell**

Als Methode der Wahl bei der Induktion einer ischämischen Läsion im Nagerhirn hat sich seit Jahren die MCA-Okklusion bewiesen, so dass es sich um das am weitesten verbreitete Modell in der experimentellen Schlaganfallforschung handelt (Liu and McCullough 2011). Durch die Okklusion der A. cerebri media an ihrem Abgang aus der A. carotis interna generiert man zuverlässig, reproduzierbar und weitestgehend nicht-invasiv Infarkte, die das Striatum und den Kortex einer Hemisphäre betreffen. Im Gegensatz dazu erfordern weiter distal okkludierende Techniken eine

Kraniotomie, wobei in diesen Modellen vor allem Infarkte entstehen, die den Neocortex betreffen. Ergänzend kommt hinzu, dass der MCA-Verschluss einem der häufigsten Infarktmuster beim Menschen entspricht, so dass auch eine gute Vergleichbarkeit zur relevanten Patientenpopulation besteht. Daher haben auch wir uns für dieses zuverlässige Modell entschieden.

#### **4.1.4 Das endoluminale Perforationsmodell der Subarachnoidalblutung**

Anders verhält es sich bei den Modellen der Subarachnoidalblutung. Hier besteht eine größere Inhomogenität. Deswegen haben Schwartz et al. mehrere Voraussetzungen für gute Modelle definiert (Schwartz, Masago et al. 2000)

1. Reproduzierbare und zuverlässige Blutung in den Subarachnoidalraum
2. Kontrollierte gleichbleibende Blutung
3. Physiologische Auslösung der Blutung
4. Blutungsverteilung entsprechend der in-vivo-Situation
5. Leichte Durchführbarkeit
6. Vertretbare Kosten

Zusammengefasst lässt sich sagen, dass es drei unterschiedliche Ansätze gibt, die diesen Voraussetzungen in Teilen gerecht werden (Megyesi, Vollrath et al. 2000). Als erste große Gruppe sind hier Techniken zu nennen, bei denen ein definiertes Volumen Eigenblut einmalig oder mehrmalig in den Subarachnoidalraum eingebracht wird, sei es in die Cisterna magna oder die Cisterna chiasmatica. Die Vorteile liegen klar auf der Hand. Es handelt sich im jeden Fall um eine einfach auszulösende, reproduzierbare Blutung mit dem immer gleichen Druckanstieg. Die Mortalität ist vergleichsweise gering, was Langzeituntersuchungen ermöglicht. Als Nachteile sind jedoch aufgrund des Fehlens begleitender Gefäß-Endothelschäden die fehlende Freisetzung vasoaktiver Substanzen und die atypische Blutungsverteilung zu nennen, da sich die meisten Aneurysmen in vorderen Kreislauf befinden. Mit diesen Modellen lassen sich vorhersagbar gut Vasospasmen generieren, sie liefern jedoch aus pathogenetischer Sicht kein physiologisches Abbild einer Subarachnoidalblutung. Unter dieser Prämisse wurde von Altay et al. (Altay, Smithson et al. 2009) ein Modell entwickelt, das nach Dissektion einer intracisternalen Vene und damit unter Einbezug eines Endothelschadens zuverlässig Vasospasmen induziert. Aber hier fehlt aufgrund der geringeren Drücke im venösen System und der daraus resultierenden geringeren Mortalität ebenfalls der direkte Bezug zur SAB beim Patienten. Zur Imitation dieser Situation wurde von Bederson et al. (Bederson, Germano et al. 1995) in der Ratte das endoluminale Perforationsmodell entwickelt, das durch eine Blutung in Höhe des Abgangs der A. cerebri media aus der A. carotis interna, bezogen auf die arteriellen Druckverhältnisse und die Mediatoren-Interaktion, der Pathophysiologie der Subarachnoidalblutung des Menschen sehr nahe kommt. Auch die Mortalität von 30% in diesem Modell entspricht der klinischen Erfahrung, was jedoch höhere Fallzahlen in den Experimenten

bedingt. Durch den unkontrollierten Blutaustritt ist jedoch eine Standardisierung der SAB schwierig. Unter Zuhilfenahme einer ICP-Messung ist es jedoch möglich eine Abschätzung der Schwere der SAB durchzuführen. Gleichzeitig können durch intensives Training und standardisierte Operationsverfahren perioperative Blutverluste, die einen großen Einfluss auf das letztendliche Ausmaß der Subarachnoidalblutung haben, auf ein Minimum reduziert werden. In Kombination mit genügend hohen Tierzahlen können so repräsentative Ergebnisse für eine spontane Ruptur eines Schädelbasisaneurysmas in der Maus gewonnen werden. Dieser Sachverhalt hat auch zu einer weiten Verbreitung dieses Modells geführt, weswegen wir uns ebenfalls für das endoluminale Perforationsmodell entschieden haben.

## 4.2 Ergebnisse

### 4.2.1 Bedeutung der „Penumbra“ für die Pathophysiologie des ischämischen Schlaganfalls

Wie einleitend bereits ausgeführt, steht die schnellstmögliche Reperfusion eines minderperfundierten Hirnareals im Fokus der Therapie des ischämischen Schlaganfalls. Allerdings sind aufgrund der damit verbundenen Blutungsrisiken die Kenntnis und das Ausmaß von potentiell noch vitalem Gewebe von entscheidender Bedeutung. Voraussetzung hierfür ist, beim Patienten individuell die Penumbra bildgebend darstellen zu können. Man hat sich dem Problem der Abgrenzung der Penumbra durch verschiedene Modalitäten zu nähern versucht, wobei alle bildgebenden, nicht-invasiven Verfahren in ihrer Aussagekraft limitiert sind, wie verschiedene Studien der letzten Jahre gezeigt haben (Wardlaw 2010). Ein grundsätzliches Problem von Perfusions-CT und DWI/PWI-MRT, um die beiden am weitesten verbreiteten Methoden zu nennen, ist die nur indirekte Darstellung der metabolischen Mangelversorgung im Penumbra-Areal. Bei diesen Methoden werden gewonnene Daten aus dem Versorgungsgebiet einer großen hirnzuführenden Arterie verwendet, um Rückschlüsse auf zelluläre Vorgänge zu ziehen. Das wiederum führt regelmäßig zur Fehleinschätzung des tatsächlich noch zu rettenden Gewebes und des damit verbundenen erhofften Mehrwerts für den Patienten (Hacke, Donnan et al. 2004).

Man ist daher nach wie vor auf der Suche nach besseren Surrogaten für das Ausmaß der Penumbra oder nach Möglichkeiten, sie im Verlauf charakterisieren zu können. In einem daran anschließenden Schritt sollen dann die gewonnenen Erkenntnisse über die Penumbra in der klinischen Routine angewendet werden. In der präklinischen Grundlagenforschung bietet die Optoakustik beziehungsweise deren Anwendung im MSOT die Gelegenheit, sich der Penumbra auf direkterem Wege zu nähern. Dazu war es aber erst einmal notwendig, zu gewährleisten, einen ischämischen Schlaganfall im MSOT darstellen zu können.

#### 4.2.2 Grundlagen der Diagnostik mit der „Multi Spectral Optoacoustic Tomography“

Wie aus Vorstudien unserer Kooperationspartner des IBMI bekannt, ist es mit dem MSOT möglich, die gesamte Anatomie des Mausgehirns zur topographischen Lokalisation sichtbar zu machen (Burton, Patel et al. 2013). Dabei sind als Vorteile der geringe Materialaufwand und die schnelle Datenakquisition, um die Untersuchungszeiten und damit die Belastung für das Tier durch die Anästhesie so gering als möglich zu halten, anzuführen. Auch in den hier gezeigten Untersuchungen dienen koronar rekonstruierte Schnittbilder als Grundlage, wie Abb. 10 zeigt. Basierend darauf sollte es theoretisch möglich sein, komplette Versorgungsgebiete einzelner Gefäße abzugrenzen und so morphologische Korrelationen zu Pathologien ziehen zu können. Die Zuhilfenahme der unterschiedlichen Absorptionseigenschaften des Hämoglobins in oxygeniertem und deoxygeniertem Zustand sollte es erlauben, Aussagen über den Sauerstoffgehalt in der Mikrozirkulation und damit in grober Annäherung auch des Parenchyms zu treffen. Durch die Verwendung des Hämoglobins als intrinsisches Kontrastmittel zur Darstellung des Blutvolumens ist es möglich, einen Sättigungseffekt, wie er bei der mehrmaligen Applikation extrinsischer Kontrastmittel und der damit verbundenen Anreicherung im Gefäßsystem auftritt, zu vermeiden. In Kombination mit den kurzen Akquisitionszeiten von 30 s für alle Wellenlängen pro Schnittebene können repetitive Messungen in Echtzeit durchgeführt werden. Diese Eigenschaften sollten es erlauben, mit einer theoretischen Auflösung von 40  $\mu\text{m}$  die Infarktstehung sowohl räumlich als auch zeitlich nachvollziehen zu können. Es muss allerdings hier einschränkend erwähnt werden, dass, mit den im Rahmen dieser Arbeit angewendeten Modellen zur Bildrekonstruktion der Rohdaten mit Rechenzeiten von bis zu 25 Stunden, eine unmittelbare Datenauslese und damit eine Interpretation „in Echtzeit“ nicht möglich sind. Zudem gibt es, wie an der Abb. 15 deutlich wird, weitere technische Einschränkungen des hier verwendeten Versuchsaufbaus. Die Vergleichbarkeit von Messungen desselben Tieres zu unterschiedlichen Zeitpunkten wird erschwert durch das Fehlen einer Arretierungsmöglichkeit für den Mausschädel, was mit technischem Aufwand generell möglich wäre. Durch die Festlegung von Messkoordinaten in x- und y-Richtung für jedes Tier entsprechen sich die jeweiligen Schichtebenen zwar annäherungsweise im zweidimensionalen Raum. Aber eine mögliche Rotation um die Achse des Tieres führt bisweilen zu unterschiedlichem Signalverhalten oder auch zu Messartefakten. Zugleich ist es zur Verbesserung der akustischen Kopplung notwendig, zwischen Schädel und der Polyethylen-Membran noch etwas Wasser zu applizieren, was bei Lufteinschlüssen zu einem drastischen Absinken der Signalqualität führt. Des Weiteren muss in dem hier verwendeten Versuchsaufbau die Beatmung mit 100% Sauerstoff beachtet werden (siehe unter 4.1.2), was vor allem in der Spektroskopie zu oftmals sehr intensitätsstarken, prominenten Oxy-Hb-Signalen führt (s. Abb. 19). Dadurch kann es zu einem verminderten Kontrast zwischen ischämischen Randbereichen und normal perfundierten Arealen und damit zu einer erschwerten Darstellung der pathophysiologisch

beeinträchtigten Areale nach Ischämie oder Subarachnoidalblutung kommen, da aufgrund der systemischen Hyperoxie eine vergleichsweise gute Sauerstoffversorgung bei durch die Erkrankung dennoch kompromittiertem Sauerstoffmetabolismus in den pathologisch veränderten, normalerweise stark hypoxischen Gewebearealen vorliegt.

#### 4.2.3 Ischämiediagnostik im MSOT

Bezogen auf die hier durchgeführte Bildgebung am Modell der fokalen Ischämie hat die Gefäßversorgung des betroffenen Hirnareals großen Einfluss auf das sich entwickelnde Läsionsareal, dessen Darstellung im optoakustischen Bild angestrebt wird. So wie es beim Menschen eine individuelle Suszeptibilität für die Folgen eines Verschlusses der A. cerebri media gibt, verhält es sich auch bei Mäusen. Das Ausmaß der Kollateralisierung bestimmt letztendlich den Schaden und somit das Signalverhalten in der Bildgebung. Während in unseren Messungen vor der Ischämie eine klare Symmetrie zwischen den Hemisphären zu erkennen ist, hebt sich dieses Muster während und 24 Stunden nach der Ischämie weitestgehend auf. Allerdings ist es nicht so, dass sich in allen Tieren ein eindeutig zu identifizierender, sich von der Lokalisation her ähnelnder, Infarktkern im MSOT ausmachen lässt, was es konsekutiv nahezu unmöglich macht, den Infarkt klar abzugrenzen. Darum ist es mit dem hier verwendeten Versuchsaufbau nicht möglich, die Ischämie im Mäusehirn zwischen Tieren zu vergleichen beziehungsweise zu quantifizieren. Mögliche Gründe hierfür sind in der – wie hier vorliegenden - Ableitung eines vaskulären Signals zu suchen, wie aus funktionellen optoakustischen Aktivierungsstudien deutlich wird: In einer Arbeit von Yao et al. wurde bei sensibler, taktiler Vorderpfotenstimulation von Mäusen unter Ausnutzung des Hämoglobinsignals die vaskuläre und, nach Gabe eines für den Glucosestoffwechsel spezifischen Kontrastmittels, die metabolische Reaktion darauf untersucht. Hierbei hat sich gezeigt, dass das durch das Hämoglobin repräsentierte Areal signifikant größer war als das durch Glucosekonzentration den Energiestoffwechsel der Neurone abbildende Gebiet (Yao, Xia et al. 2013). Um eine umfassende Kenntnis der Stoffwechselvorgänge im Infarktkern und in der umliegenden Penumbra zu erlangen, ist daher die Verwendung des Hämoglobins als einziger Bildgebungsmarker nicht ausreichend.

Zugleich hat die subjektive Bewertung eines, wenn auch verblindeten, Befunders hinsichtlich der Beurteilung einer Ischämie bei nicht klinisch etablierten und somit validierten Bildgebungsverfahren seine Limitationen. Wie aber die von uns durchgeführte Quantifizierung des Signals nach Mittelung über ausgewählten Arealen im Infarktkern bzw. dem umliegenden Gewebe (s. Abb. 16) zeigt, kommt es im Infarktkern zu einem deutlichen Abfall des CBV in der Ischämie, was beweisend für eine erfolgreiche Okklusion der A. cerebri media ist. Im Gegensatz dazu vollzieht sich in angrenzenden Arealen das Gegenteil, es kommt zu einer konsistenten Blutvolumenzunahme, was auf eine Rekrutierung von Kollateralgefäßen hinweist. Das steht im Einklang mit den praktischen Grundlagen und den daraus gefolgerten Schlüssen der, in der klinischen Anwendung eingesetzten,

kontrastmittelunterstützten CT-Perfusionsbildgebung. Basierend auf diesen gemessenen Veränderungen wird die Indikation zur Lyse und damit zur kausalen Therapie des Schlaganfalls gestellt (Wintermark, Flanders et al. 2006). Limitiert durch die Tatsache, dass es sich nur um Vergleichswerte zwischen den Hemisphären - bezogen auf zuvor ausgewählte definierte Areale - handelt, können wir dennoch in unserem Versuchsaufbau ohne die Applikation von Kontrastmittel Parameter erfassen, die es uns ermöglichen, einen Infarktkern von umliegendem hämodynamisch kompromittiertem Gewebe zu unterscheiden. Grundsätzlich ist zu diskutieren, ob die Größe der hier veranschlagten ROIs zu konservativ veranschlagt ist, da das Infarktareal ja weitaus größer anzunehmen ist. Jedoch ist aufgrund der Inhomogenität der Infarktverteilung zwischen den Tieren bei ausgedehnteren ROIs der sichere Einschluss eines infarzierten Areals bei allen Tieren nicht gewährleistet. Oder es könnten die Randbereiche des Infarkts, die sich ja vollkommen anders verhalten, ebenfalls in die Berechnung mit einbezogen werden. Ob prinzipiell die Voraussetzungen zur Detektion und räumlichen Abgrenzung einer Penumbra mittels MSOT gegeben sind, ist jedoch damit nicht abschließend beantwortet. Es ist hier lediglich festzuhalten, dass eine räumlich abgegrenzte Definition des Areals anhand der Bilder, die mit dem von uns verwendeten Aufbau erhalten wurden, nicht sicher möglich ist.

#### 4.2.4 Funktionelle Aspekte der Ischämiebildung mit dem MSOT

Da die Möglichkeiten der Quantifizierung einer zerebralen Ischämie mittels des hier verwendeten MSOT beschränkt sind, stellt sich die Frage, ob das MSOT aufgrund seiner Eigenschaften in Hinsicht auf die funktionelle Charakterisierung der Ischämie, beziehungsweise der Penumbra, einen Mehrwert aufweist. Die Energieversorgung des Gehirns hängt von mehreren Parametern ab, die in enger Beziehung zueinander stehen und konstant gehalten werden müssen, um die funktionale Integrität des Gehirns zu gewährleisten. Neben dem CBF sind das die Sauerstoff-Metabolisierungsrate des Gehirns (cerebral metabolic rate of oxygen,  $CMRO_2$ ) und die arteriovenöse Sauerstoffdifferenz (oxygen extraction fraction, OEF), die folgendermaßen zusammenhängen:  $CMRO_2 = CBF \times SaO_2 \times OEF$ . Die  $CMRO_2$  ist hierbei der zuverlässigste Parameter für die Funktionalität des Gewebes, mit einem Grenzwert von  $65 \mu\text{mol}/100\text{g} \times \text{min}$  im Menschen. Weil in gesundem Gewebe die Sauerstoffsättigung bei normaler Lungenfunktion konstant ist und die OEF stabil gehalten wird, sind die  $CMRO_2$  und die CBF nahezu proportional zueinander (Fisher and Bastan 2012). Im Gegensatz dazu kommt es in ischämischen Hirnarealen beim Menschen zu einer Umverteilung. In den bereits nekrotisch veränderten Zellen im Infarktkern kann keine Sauerstoffaufnahme mehr erfolgen, daher ist die OEF klein. In der Penumbra hingegen ist sie hoch, weil der Abfall der  $CMRO_2$  unter den Grenzwert bei sinkendem CBF verhindert werden soll (Baron 1999). Mit der spektroskopischen Aufarbeitung der im MSOT gewonnenen Daten lassen sich die Konzentrationen des oxygenierten und deoxygenierten Hämoglobins bestimmen. Dadurch kann man sich der OEF und damit indirekt der

Abgrenzung zwischen Infarkt und Penumbra nähern. In den hier gezeigten Versuchen war bei allen Tieren über dem Gefäßversorgungsgebiet der okkludierten A. cerebri media eine Asymmetrie zugunsten des DeOxy-Hämoglobinsignals zu sehen, was qualitativ einer Erhöhung der OEF entsprechen kann. Allerdings müssen diesbezüglich Einschränkungen gemacht werden. Da es sich dabei um relative Werte handelt und qualitative signifikante Vergleichswerte nur für das CBV, also die totale Hämoglobinkonzentration vorliegen, und nicht direkt die Konzentration des deoxygenierten Hämoglobins kann der Anstieg des DeOxy-Signals auch durch die allgemeine Blutvolumenzunahme in dem Areal bedingt sein. Dieses Problem ließe sich durch die quantitative Bestimmung der Hämoglobinkonzentrationen umgehen, wozu man jedoch die arterielle Sauerstoffkonzentration im zuführenden Gefäß bräuchte, die wir hier nicht bestimmt haben. Es gibt jedoch bereits andere Arbeiten, in denen dieser Parameter nicht-invasiv mit optoakustischen Methoden berechnet wurde (Laufer, Delpy et al. 2007). Nichtsdestoweniger bliebe nach wie vor das Problem, dass die Auflösung des hier verwendeten Geräts nicht ausreicht, um die Sättigungswerte ortsgenau zu bestimmen, also die Verhältnisse in der Mikrozirkulation abzubilden. Eine echte Differenzierung zwischen Infarktkern und Penumbra basierend auf einer Hämoglobin-Spektroskopie ist demzufolge nicht zu bewerkstelligen.

Unter Ausnutzung der physikalischen Eigenschaften des MSOTs können theoretisch weitere Parameter der zerebralen Energieversorgung abgeleitet werden. Die Bestimmung der  $CMRO_2$  erfordert, wie oben ausgeführt, die Kenntnis mehrerer Größen. Einerseits benötigt man das CBV, das durch Erfassung der totalen Hämoglobinkonzentration berechnet werden kann, und andererseits den CBF, der durch das Anflutungsverhalten eines intravenös verabreichten ICG-Bolus in einer dynamischen Messung unter Berücksichtigung der schnellen Akquisitionszeiten im MSOT bestimmt werden kann. Allerdings verfügen wir bei CBV, in Analogie zur Spektroskopie, in Ermangelung der arteriellen Sauerstoffsättigung nur über Relativwerte. Die Pharmakodynamik des verabreichten ICG konnte in dem hier verwendeten Aufbau weder zeitlich noch räumlich präzise nachvollzogen werden. Zusammenfassend lässt sich Folgendes sagen: Das Vorliegen einer fokalen zerebralen Ischämie im Mäusehirn lässt sich anhand der Asymmetrie im Verteilungsmuster des DeOxy-Hämoglobinsignals reproduzierbar und auch noch nach 24 h eindeutig nachweisen. Die genauere Charakterisierung einer zerebralen Ischämie ist mit dem hier verwendeten technischen Aufbau des MSOT im Allgemeinen und im Vergleich zu anderen etablierten bildgebenden Verfahren im Detail jedoch nicht möglich.

#### **4.2.5 Methodische Evaluation des MSOTs bei der Subarachnoidalblutung**

Da sich eine signifikante Hypoperfusion des Gehirns in einem Modell fokaler Ischämie valide nachweisen ließ, versuchten wir zur näheren Charakterisierung der Frühphase der SAB ebenfalls umschriebene minderdurchblutete Areale mit Hilfe des MSOTs zu finden. Nachdem es unmittelbar

nach der Blutung durch die starke intrakranielle Druckerhöhung zu einer globalen Ischämie kommt und sich die langzeitprognosebestimmenden, räumlich klar differenzierten Minderperfusionsen erst im Verlauf entwickeln, wurde eine erste Messreihe nach 24 h durchgeführt. Ein weiteres Argument für dieses Vorgehen stellt die potentielle Überlagerung der intraparenchymatösen Signalveränderungen durch das Vorliegen stark oxygenierten arteriellen Blutes im Subarachnoidalraum direkt nach dem Ereignis dar. Zugleich war es Ziel, das Ausmaß der Blutung, das im klinischen Rahmen mit der Prognose korreliert, zu vermessen und damit einen weiteren Parameter für die Schwere der SAB zu erheben. Hier zeigt sich, wie Abb. 17 zu entnehmen ist, in der morphologischen Bildgebung ein den Infarkt-Tieren ähnliches Bild. Als Unterschied ist jedoch die stärkere Kontrastierung der Blutgefäße, insbesondere der Sinus, die druckbedingt gestaut sein können, zu nennen. Ebenso erscheint eine diskrete Signalanhebung linksparietal, die auf die Implantation der Druckmesssonde zurückzuführen ist, die auch 24 h nach ihrer Entfernung zu Signalinterferenzen führt. Unabhängig davon lässt sich das unmittelbar über den Hemisphären gelegene Blut, das in der korrelierenden Histologie eindeutig zu erkennen ist, im MSOT-Bild nicht abgrenzen. Aus diesem Grund sind eine volumetrische Messung und damit eine Stratifizierung der Schadensschwere der Blutung mittels der hier verwendeten Messvorrichtung nicht möglich. Allerdings gibt es für die Maus, basierend auf dem initialen intrakraniellen Druckanstieg, bereits sehr gute Vergleichsdaten zur Einordnung der Schwere einer experimentellen SAB (Feiler, Friedrich et al. 2010).

Der Frage nachgehend, ob uns die Hämoglobin-Spektroskopie 24 h nach Blutung mehr über Hypoperfusionen zu sagen vermag, ist zu konstatieren, dass das Signalmuster des ganzen Gehirns im Vergleich zum SHAM-operierten Tier, wie Abb. 19 zeigt, inhomogener aussieht. Allerdings lassen sich keine Zuordnungen zu territorialen Gefäßversorgungsgebieten ableiten. Zugleich bleibt die Frage offen, ob es sich dabei um eine echte Minderperfusion handelt oder um einen Hypometabolismus, weil der regionale CBF, aufgrund der oben bereits ausgeführten technischen Limitationen des MSOT, auch in den ICG-gestützten Messungen nicht erhoben werden konnte.

In Kenntnis dieser Limitationen und der Einschätzung, sie - auch aufgrund der Erfahrungen im Modell der fokalen Ischämie - optimieren zu können, haben wir eine zweite Versuchsreihe gestartet. Hierzu stand uns ein MSOT mit verbesserter Auflösung zur Verfügung. Wir wollten die Druckmesssonde nach 24 h, zur Vermeidung eines weiteren Gewebeschadens, nicht noch einmal implantieren und wir haben eine präoperative Vergleichsmessung durchgeführt, zumal sich, seit der Erstbeschreibung einer akuten Vasokonstriktion nach einer SAB in der Ratte durch Bederson, viele Arbeitsgruppen der näheren Charakterisierung dieses CPP-unabhängigen Blutflussabfalls unmittelbar nach dem Blutungsereignis gewidmet und hypoperfundierte Bereiche nachgewiesen haben. In einem endoluminalen Perforationsmodell der Ratte, gestützt auf kernspintomographische Messungen, hat

die Gruppe um van den Bergh die Subarachnoidalblutung akut und im Verlauf näher charakterisiert. Sie konnten bei Messungen 1 h, sowie 2 und 9 Tage nach der Blutung eine Zunahme der ischämischen Läsionen binnen 48 h darstellen und mit einem Abfall des regionalen Blutflusses in Zusammenhang bringen (van den Bergh, Schepers et al. 2005). Es kommt also zu verschiedenen Zeitpunkten nach der SAB zu ausgeprägten Änderungen der zerebralen Durchblutung, die wir mittels MSOT näher charakterisieren wollten.

Allerdings haben die erneuten Messungen keine weiteren Erkenntnisse gebracht. Aufgrund der Mortalität von 100 % binnen 24 h liegen keine Langzeitdaten vor, und im Vergleich der präoperativen Bilder mit denen unmittelbar nach Blutung ist keine signifikante Änderung des Signalverhaltens, weder am isosbestischen Punkt, noch in der Spektroskopie auszumachen. Aus diesem Grund haben wir auch auf weitere Analysen mittels ROI-Methode verzichtet. Gründe hierfür können - wie mehrmals bereits erwähnt - in der zu geringen Auflösung des MSOTs in Adaption auf die Mikrozirkulation zu suchen sein oder in der Pathophysiologie der SAB begründet sein, bei der es ja keine umschriebenen, einseitig auftretenden großflächigen hypoxischen Areale wie beim Infarkt gibt. Es ist davon auszugehen, dass die möglicherweise vorhandenen minderperfundierten Bereiche aufgrund ihrer diffusen Verteilung mittels unseres Versuchsaufbaus nicht voneinander zu unterscheiden waren. Vielleicht ist aber auch das Ausmaß der globalen Ischämie in der hochakuten Phase der SAB so groß, dass die Festlegung eines Schwellenwertes für Hypoxie mit den hier verwendeten relativen Messungen nicht möglich ist, was eine exakte Differenzierung von Oxygenierungszuständen im Parenchym unmittelbar nach Blutung nicht zulässt.

Zusammenfassend lässt sich somit für die Verwendung des MSOT zur näheren Darstellung einer Subarachnoidalblutung feststellen, dass mit der hier verwendeten technischen Ausstattung eine detaillierte, nachvollziehbare Beschreibung der zerebralen Durchblutung nach SAB nicht möglich ist.

#### **4.2.6 Perspektiven der optoakustischen Bildgebung**

Ein echter Vorteil des MSOT zur Darstellung der Pathophysiologie der fokalen zerebralen Ischämie und der Subarachnoidalblutung lässt sich aus unseren Ergebnissen nur bedingt ableiten. Daher ist es für eine weitere Verwendung des MSOT in diesen Modellen erstens wichtig festzuhalten, was von einer multimodalen Bildgebung zur Bearbeitung dieser Fragestellungen zum jetzigen Zeitpunkt erwartet werden kann. Zweitens stellt sich die Frage, inwiefern das MSOT das Potential besitzt, diesem Anspruch gerecht zu werden. Und drittens soll dem Umstand nachgegangen werden, was das MSOT aufgrund seiner physikalischen Eigenschaften an Mehrwert gegenüber den etablierten Verfahren erwarten lässt.

Zur eindeutigen Klärung der ersten Frage ist als Maßstab die Kleintier-Kernspintomographie zu nennen, die es mittels leistungsstarker Magnetfeldspulen ermöglicht, die wichtigen Parameter der zerebralen Energieversorgung nicht-invasiv mit einer Ortsauflösung von 40  $\mu$ l Voxelgröße und einem

Signal-to-noise-Verhältnis von 25:1 in Mäusehirn zu bestimmen, wie Zhu et al. mit der <sup>17</sup>O-MR-Spektroskopie in einem Modell fokaler Ischämie gezeigt haben (Zhu, Chen et al. 2013). In einem Rattenmodell der SAB ist dies auch einer Gruppe um Tiebosch zum Monitoring der Blutflussveränderungen und damit verbundener zerebraler Ischämien mit seriellen kernspintomographischen Messungen gelungen (Tiebosch, van den Bergh et al. 2013).

Gemessen an diesen Voraussetzungen einer zeitgemäßen multiparametrischen Bildgebung ist es mittels MSOT, wie in Kapitel 4.2.4 bereits ausgeführt, theoretisch möglich alle für den zerebralen Sauerstoffmetabolismus im Nager wichtigen Parameter zu bestimmen. Die Konkurrenzfähigkeit zur Kernspintomographie ist, diese Anforderungen betreffend, also eigentlich gegeben.

Unabhängig davon hat sich jedoch in all unseren Untersuchungen als limitierender Faktor immer die zu geringe Auflösung des MSOTs gezeigt, sodass eine zuverlässige Evaluation der Mikrozirkulation, die ja an der Pathophysiologie der Ischämie und der SAB entscheidend beteiligt ist, selbst nach Erhebung all dieser Parameter nicht möglich ist. Allerdings gibt es einerseits Bemühungen, sich diesem Problem mit geschlossenen zirkulären Detektorbatterien zu nähern (Li, Aguirre et al. 2010) und andererseits durch die Verwendung leistungstärkerer Laser die optische Flusssdichte in der Tiefenpenetration zu erhöhen, um so qualitativ hochwertigere Ultraschallbilder ableiten zu können.

Darüber hinaus bietet das MSOT, um damit die dritte Frage zu beantworten, als optisch basierte Methode die Möglichkeit, Fluoreszenzmarker einzusetzen. Durch den Vorteil einer ultraschallbasierten Bildgebung mit ihren kurzen Akquisitionszeiten können zelluläre Vorgänge dynamisch in vivo nachvollzogen werden (Ntziachristos, Bremer et al. 2003). Das ist als klarer Mehrwert gegenüber der Kernspintomographie zu nennen. Im Zusammenhang mit den hier vorgestellten Modellen wäre es zum Beispiel denkbar, durch Fluoreszenz-Marker-Koppelung an Leukozyten den Beitrag von Entzündungsprozessen bei der Entwicklung der Penumbra im Modell der fokalen Ischämie darzustellen. Zudem könnte man durch die Markierung von Thrombozyten der Frage nachgehen, ob dem CPP-unabhängigen Blutflussabfall unmittelbar nach Subarachnoidalblutung wirklich ein echter Vasospasmus der Mikrozirkulation zugrunde liegt, oder doch mikrothrombotische Ereignisse. Die Möglichkeiten - vor allem in der präklinischen Forschung - sind groß, zumal das MSOT in seinen Anschaffungskosten, der Möglichkeit serieller nicht-invasiver Bildgebung und der Verwendung in vielen verschiedenen Fragestellungen sowohl finanz- als auch zeitökonomisch eingesetzt werden kann.

#### **4.2.7 Applikation von Perfluorocarbonen nach Subarachnoidalblutung**

Wie bereits umfassend dargelegt spielen ischämische Prozesse auch bei der Subarachnoidalblutung eine große Rolle. Im Gegensatz zu einem ischämisch bedingten Schlaganfall kommt es nicht direkt nach dem Ereignis zur Minderdurchblutung klar definierter Gefäßversorgungsgebiete, sondern zuerst zu einer globalen Mangelversorgung des Gehirns und erst im Verlauf zu regional umgrenzten

Ischämien. Die Ursachen dieser Ischämien sind jedoch, wie in der Einleitung ausführlich besprochen, multifaktorieller Genese. Ein wesentliches Ziel der symptomatischen Behandlung, nach Sanierung des verursachenden Aneurysmas, stellt daher unabhängig von der Ursache der Hypoxie die Aufrechterhaltung einer ausreichenden Sauerstoffversorgung über einen längeren Zeitraum dar. Diesem Anlass entsprechend wurde im Rahmen dieser Arbeit Oxycyte<sup>®</sup>, ein artifizieller Sauerstoffträger auf Perfluorocarbonbasis, im endoluminalen Modell der Subarachnoidalblutung evaluiert. Neuere Perfluorocarbone wurden bei verschiedenen neurologischen Krankheitsbildern bereits eingesetzt, diese Arbeit stellt unserem Wissen nach jedoch die erste Testung bei der Subarachnoidalblutung dar.

Bei im Mittel nahezu identischem intrakranielltem Spitzendruck in beiden operierten Gruppen zeigt sich bei allen erhobenen Parametern das gleiche Bild. Die Tiere, die Oxycyte<sup>®</sup> erhalten haben, sind insgesamt stärker betroffen: Bezogen auf den Hirnwassergehalt gibt es keinen eindeutigen Vorteil für das Oxycyte<sup>®</sup>, aber die funktionelle Testung der behandelten Tiere fällt deutlich schlechter aus. Dazu kommt, dass bei gleichem Operateur die Sterberate binnen 24 h nach Gabe des Perfluorocarbons um 50% höher lag als in der Vergleichsgruppe. Allgemein ist die Mortalitätsrate aller operierten Tiere mit 33% vergleichbar mit in anderen Studien erhobenen Daten (Titova, Ostrowski et al. 2009), sodass diesem Sachverhalt auch nur statistisch vertretbare breit gestreute Abweichungen vom Mittelwert zugrunde liegen können.

Die verblindete Erhebung kognitiver Fähigkeiten nach 24 Stunden mittels eines funktionellen Scores sieht auch die behandelten Tiere schwerer betroffen. Allerdings kann hier eine zu geringe Trennschärfe der Testbarriere diskutiert werden. Einerseits erfolgte eine Stratifizierung in drei Gruppen, die keine detaillierte Auftrennung nach einzelnen Teilleistungsgebieten erlaubt. Aus diesem Grund können erkrankungsspezifische Teilleistungsschwächen übersehen werden. Zugleich ist der initiale Score für ein Modell fokaler zerebraler Ischämie erstellt worden (Chen, Li et al. 2001). Trotz der sorgfältigen Anpassungen an die Erfordernisse einer validen Testung für die SAB können die damit verbundenen funktionellen Beeinträchtigungen unzureichend abgebildet worden sein. Die Testbatterie mit ihren vier Items ist vielleicht nicht suffizient genug, um ein differenziertes Abbild neurologischer Ausfälle zu leisten. Aber auch andere, umfassendere Testungen nach SAB haben kein einheitliches Bild ergeben, weswegen allgemeine Empfehlungen nach wie vor ausstehen (Jeon, Ai et al. 2009). Zusätzlich stellt sich die Frage, ob der Zeitpunkt für die Erhebung funktioneller Parameter nicht zu früh gewählt war? Denn die Beeinträchtigung durch die Blutung kann nach 24 h noch immanenter Einfluss vor allem auf die Vigilanz und konsekutiv auf das Verhalten der Tiere haben.

Die Entstehung eines zerebralen Ödems nach Subarachnoidalblutung korreliert beim Menschen mit einem schlechteren klinischen Verlauf und ist ein prognostisch ungünstiger Parameter (Claassen, Carhuapoma et al. 2002). Daher ist es möglich, das Ausmaß und die Entwicklung eines Ödems zur

Abschätzung der Schwere und des Verlaufs einer SAB heranzuziehen, wie bereits in einem analogen Nagermodell umgesetzt (Thal, Sporer et al. 2009). In den hier gezeigten Versuchen weisen die Tiere mit Blutung einen signifikant höheren prozentualen Hirnwassergehalt, als Surrogat für ein zerebrales Ödem, im Vergleich mit SHAM-Tieren auf. Demgegenüber unterscheiden sich die NaCl- und die Oxycyte<sup>®</sup>-Gruppe in diesem Parameter nicht. Allerdings ist die Wertigkeit des prozentualen Hirnwassergehalts als Indikator für das Ausmaß eines zerebralen Ödems umstritten, weil die Änderung des Hirnwassergehalts nicht zwangsläufig die Schwere des Ödems exakt abbildet (Keep, Hua et al. 2012). Da zwischen den beiden operierten Gruppen jedoch kein signifikanter Unterschied des prozentualen Hirnwassergehalts festgestellt worden ist, ist anzunehmen, dass eine direkte, technisch aufwändigere Messung des Ödems keine anderen Ergebnisse zur Folge gehabt hätte.

Unabhängig vom Ausmaß des zerebralen Ödems nach SAB kommt es durch den Einsatz von Oxycyte<sup>®</sup> zu einem schlechteren funktionellen Outcome der Tiere zur Vergleichsgruppe. Die Ursache dafür muss demzufolge in der Applikation des Perfluorocarbons selber zu suchen sein. Sie kann einerseits der höheren Viskosität der Oxycyte<sup>®</sup>-Lösung im Vergleich zu NaCl geschuldet sein, was zu einer schlechteren zerebralen Durchblutung geführt haben könnte. Laut Herstellerangaben war die verwendete Konzentration aber für die intravenöse Gabe zugelassen, wobei zur Maus wenig vergleichbare Daten vorliegen. Andererseits war es notwendig, aufgrund der linearen Sauerstoffbindungskurve der PFCs eine kontinuierliche Beatmung mit 100% Sauerstoff vorzunehmen, um die bestmögliche Oxygenierung des Gewebes zu gewährleisten. Das kann zur übermäßigen Bildung reaktiver Sauerstoffradikale führen, die, wie einleitend bereits ausgeführt, ganz wesentlich an der Pathophysiologie der SAB beteiligt sind. Vor allem in der Akutphase werden die antioxidativen Systeme stark beansprucht und die dementsprechenden Reservekapazitäten schnell erschöpft. Die Applikation des Perfluorocarbons und die Hyperoxygenierung erfolgten unmittelbar nach der Blutung, d.h. zu einem Zeitpunkt, an dem die Vulnerabilität des Parenchyms für eine oxidative Schädigung am größten anzunehmen ist. Zugleich fallen durch den permanenten Abbau des subarachnoidalen Hämoglobins ständig neue Radikale an, die eine effektive Regeneration der Antioxidantien verhindern. Da die ROS allerdings an vielen Interaktionen auf zellulärer Ebene beteiligt sind, ist ein kausaler Beitrag zum schlechteren Abschneiden der Oxycyte<sup>®</sup>-Tiere schwer zu beweisen.

Um die therapeutische Wertigkeit von Oxycyte<sup>®</sup> in der SAB näher zu objektivieren, müsste man konsequenterweise, um eine Überlastung der antioxidativen Systeme in der Frühphase zu vermeiden, erst später im Verlauf mit der Hyperoxygenierung beginnen; oder man müsste in Analogie zur hyperbaren Hyperoxygenierung bei der Caisson-Krankheit kürzere Phasen der Sauerstoffbeatmung repetitiv durchführen, um die mit der Radikalbildung einhergehenden negativen Effekte zu minimieren.

Als Zusammenfassung dieser ersten Pilotstudie haben wir mit der hier angewendeten langandauernden Hyperoxygenierung über 24h keinen positiven therapeutischen Effekt der Verabreichung von künstlichen Sauerstoffträgern in der Akutphase nach SAB zeigen können. Im Gegenteil haben wir sogar einen negativen Einfluss auf die Sterblichkeit und das funktionelle Outcome aufgezeigt, so dass weitere Untersuchungen u.a. mit kürzeren Hyperoxygenierungsphasen und angepasster Oxycyte<sup>®</sup>-Dosierung notwendig sind, um diese Fehlerquellen beheben zu können.

## 5 Zusammenfassung

Zerebrovaskuläre Ereignisse, zu denen der ischämische Schlaganfall und die Subarachnoidalblutung zählen, sind hauptverantwortlich für eine dauerhafte Behinderung in der westlichen Welt. Gemeinsam ist all jenen Erkrankungen, dass sie unabhängig von ihrer Pathophysiologie zu einer Störung der zerebralen Blutversorgung und damit des Sauerstoffangebotes führen. Ziel dieser hier vorgestellten Arbeit war es, diesen Zustand der Mangelversorgung in der Maus näher zu charakterisieren und ein diesbezüglich neues therapeutisches Konzept zu evaluieren. In einer ersten Versuchsreihe wurde in einem Modell fokaler Ischämie die Wertigkeit der „Multi Spectral Optoacoustic Tomography“ zur Detektion einer Hypoxie evaluiert. Bei dieser Methode handelt es sich um nichtinvasives bildgebendes Verfahren, bei dem mittels der Induktion von Lichtpulsen im Nanosekundenbereich durch die Generierung von Druckwellen im Gewebe, in unserem Fall dem Gehirn, über Ultraschalldetektoren ein zweidimensionales Schnittbild erzeugt wird. Mit dem MSOT können jedoch nicht nur morphologische, sondern auch funktionelle Parameter, wie die Sauerstoffkonzentration im Gehirn, abgeleitet werden. Daher wurden vor, während und nach Induktion eines Hirninfarkts durch einen gezielten Verschluss der A. cerebri media Tomographien des Gehirns erstellt und miteinander verglichen. Hierbei zeigt sich, dass eine Asymmetrie zwischen den Hemisphären nach Infarkt zu sehen ist, deren Ausmaß sich aber nicht auf den ersten Blick quantifizieren lässt. Nach einem Vergleich der Hemisphären untereinander sieht man in allen Tieren einen signifikanten Abfall des totalen zerebralen Blutvolumens im postulierten Infarktgebiet. Dies kann als Beweis einer erfolgreichen Okklusion der A. cerebri media gelten und der damit verbundenen Möglichkeit das MSOT zur Infarktdetektion einzusetzen. Interessanter jedoch war eine relative Erhöhung des Blutvolumens an den Randbereichen des Infarkts, was einer reaktiven Vasodilatation gleichzusetzen ist. Durch das MSOT lässt sich zwischen Infarktkern, der bereits totes Gewebe repräsentiert, und umliegenden Parenchym differenzieren, was die Abschätzung einer „Penumbra“ erlaubt. Dieses vital bedrohte, aber potentiell zu erhaltende Gewebe spiegelt das Ziel jeder therapeutischen Intervention beim ischämischen Schlaganfall wieder. Aus diesem Grund ist deren Größenabschätzung von entscheidender Bedeutung für die Prognose und die langfristige Lebensqualität von Infarktpatienten.

Nach Führung des Nachweises einer Hypoxiebildung mittels MSOT im Schlaganfallmodell wurde in einer zweiten Versuchsreihe die Sauerstoffversorgung im Verlauf der Subarachnoidalblutung zu charakterisieren versucht. Durch eine Perforation der A. carotis interna mit einem intraarteriell eingebrachten Filament wird eine spontane Aneurysmaruptur, die beim Menschen in den meisten Fällen für eine SAB verantwortlich ist, in der Maus imitiert. Wir wollten mit dem MSOT, neben der Darstellung des subarachnoidalen Blutes, minderperfundierte Areale im Gehirn nach 24 h

nachweisen, die als ein wesentlicher Beitrag zur sekundären Verschlechterung von SAB-Patienten nach Beseitigung des auslösenden Aneurysmas verstanden werden. In einer zweiten Versuchsreihe mit technisch besserer Ausstattung wurden Tiere bereits unmittelbar nach Blutung im MSOT vermessen. In keinem der Versuche ließ sich quantifizierbares subarachnoidales Blut oder ein Unterschied vor und nach SAB in der Oxygenierung des Parenchyms nachweisen. Mit dem MSOT kann diesbezüglich also keine nähere Aussage gemacht werden.

Unabhängig davon wurde in einer Therapiestudie zur Optimierung der Oxygenierung in der akuten Phase nach Subarachnoidalblutung ein synthetisches Sauerstoffersatzprodukt evaluiert. Basierend auf seinen chemischen und strukturellen Eigenschaften sollte Oxycyte<sup>®</sup>, ein Perfluorocarbon der dritten Generation, das seine Wertigkeit bereits in einem Modell fokaler Ischämie in der Ratte gezeigt hat, auch die Sauerstoffversorgung - und damit die Langzeitprognose - verbessern. Hierbei wurde Mäusen unmittelbar nach einer SAB, analog zu den Bildgebungsversuchen mittels endoluminalem Perforationsmodell ausgelöst, entweder Oxycyte<sup>®</sup> oder als Vergleichssubstanz Kochsalz in gleicher Menge gespritzt. Nach 24 Stunden wurde neben Gesamtsterblichkeit und kognitiven Fähigkeiten auch der Hirnwassergehalt der Tiere, der die Abschätzung des durch die SAB induzierten zerebralen Ödems und damit des Schadens erlaubt, untersucht. Hierbei hat sich in den funktionellen Parametern wie Überleben und neurologisches Outcome ein schlechteres Abschneiden der mit Oxycyte<sup>®</sup> behandelten Tiere gezeigt, jedoch war kein Unterschied im prozentualen Hirnwassergehalt im Vergleich zur Vehikelgruppe zu verzeichnen. Gründe hierfür könnten in der Induktion von Sauerstoffradikalen durch die notwendige Hyperoxygenierung mit 100% Sauerstoff in der Oxycytegruppe liegen. Weitere Untersuchungen zur Überprüfung dieser Hypothese und zur Abklärung eines prinzipiellen therapeutischen Potentials von Oxycyte<sup>®</sup> bei SAB stehen aber noch aus.

## Literaturverzeichnis

Altay, T., S. Smithson, N. Volokh, P. A. Rasmussen, R. M. Ransohoff and J. J. Provencio (2009). "A novel method for subarachnoid hemorrhage to induce vasospasm in mice." J Neurosci Methods 183(2): 136-140.

Asano, T. (1999). "Oxyhemoglobin as the principal cause of cerebral vasospasm: a holistic view of its actions." Crit Rev Neurosurg 9(5): 303-318.

Asano, T., I. Ikegaki, S. Satoh, Y. Suzuki, M. Shibuya, K. Sugita and H. Hidaka (1990). "Endothelin: a potential modulator of cerebral vasospasm." Eur J Pharmacol 190(3): 365-372.

Astrup, J., B. K. Siesjö and L. Symon (1981). "Thresholds in cerebral ischemia - the ischemic penumbra." Stroke 12(6): 723-725.

Ayer, R. E. and J. H. Zhang (2008). "Oxidative stress in subarachnoid haemorrhage: significance in acute brain injury and vasospasm." Acta Neurochir Suppl 104: 33-41.

Baron, J. C. (1999). "Mapping the ischaemic penumbra with PET: implications for acute stroke treatment." Cerebrovasc Dis 9(4): 193-201.

Bederson, J. B., I. M. Germano and L. Guarino (1995). "Cortical blood flow and cerebral perfusion pressure in a new noncraniotomy model of subarachnoid hemorrhage in the rat." Stroke 26(6): 1086-1091; discussion 1091-1082.

Bederson, J. B., A. L. Levy, W. H. Ding, R. Kahn, C. A. DiPerna, A. L. Jenkins, 3rd and P. Vallabhajosyula (1998). "Acute vasoconstriction after subarachnoid hemorrhage." Neurosurgery 42(2): 352-360; discussion 360-352.

Broderick, J. P., T. G. Brott, J. E. Duldner, T. Tomsick and A. Leach (1994). "Initial and recurrent bleeding are the major causes of death following subarachnoid hemorrhage." Stroke 25(7): 1342-1347.

Burton, N. C., M. Patel, S. Morscher, W. H. Driessen, J. Claussen, N. Beziere, T. Jetzfellner, A. Taruttis, D. Razansky, B. Bednar and V. Ntziachristos (2013). "Multispectral Opto-acoustic Tomography (MSOT) of the Brain and Glioblastoma Characterization." Neuroimage 65: 522-528.

Busch, E., C. Beaulieu, A. de Crespigny and M. E. Moseley (1998). "Diffusion MR imaging during acute subarachnoid hemorrhage in rats." Stroke 29(10): 2155-2161.

Cahill, J. and J. H. Zhang (2009). "Subarachnoid hemorrhage: is it time for a new direction?" Stroke 40(3 Suppl): S86-87.

Chappell, E. T., F. C. Moure and M. C. Good (2003). "Comparison of computed tomographic angiography with digital subtraction angiography in the diagnosis of cerebral aneurysms: a meta-analysis." Neurosurgery 52(3): 624-631; discussion 630-621.

Chen, J., Y. Li, L. Wang, Z. Zhang, D. Lu, M. Lu and M. Chopp (2001). "Therapeutic benefit of intravenous administration of bone marrow stromal cells after cerebral ischemia in rats." Stroke 32(4): 1005-1011.

Claassen, J., J. R. Carhuapoma, K. T. Kreiter, E. Y. Du, E. S. Connolly and S. A. Mayer (2002). "Global cerebral edema after subarachnoid hemorrhage: frequency, predictors, and impact on outcome." Stroke 33(5): 1225-1232.

Cox, B., J. G. Laufer, S. R. Arridge and P. C. Beard (2012). "Quantitative spectroscopic photoacoustic imaging: a review." J Biomed Opt 17(6): 061202.

Crowley, R. W., R. Medel, N. F. Kassell and A. S. Dumont (2008). "New insights into the causes and therapy of cerebral vasospasm following subarachnoid hemorrhage." Drug Discov Today 13(5-6): 254-260.

Culp, W. C., S. D. Woods, R. D. Skinner, A. T. Brown, J. D. Lowery, J. L. Johnson, E. C. Unger, L. J. Hennings, M. J. Borrelli and P. K. Roberson (2012). "Dodecafluoropentane emulsion decreases infarct volume in a rabbit ischemic stroke model." J Vasc Interv Radiol 23(1): 116-121.

Daugherty, W. P., J. E. Levasseur, D. Sun, B. D. Spiess and M. R. Bullock (2004). "Perfluorocarbon emulsion improves cerebral oxygenation and mitochondrial function after fluid percussion brain injury in rats." Neurosurgery 54(5): 1223-1230; discussion 1230.

Davis, S. M., G. A. Donnan, M. W. Parsons, C. Levi, K. S. Butcher, A. Peeters, P. A. Barber, C. Bladin, D. A. De Silva, G. Byrnes, J. B. Chalk, J. N. Fink, T. E. Kimber, D. Schultz, P. J. Hand, J. Frayne, G. Hankey, K. Muir, R. Gerraty, B. M. Tress, P. M. Desmond and E. investigators (2008). "Effects of alteplase beyond 3 h after stroke in the Echoplanar Imaging Thrombolytic Evaluation Trial (EPITHET): a placebo-controlled randomised trial." Lancet Neurol 7(4): 299-309.

de Rooij, N. K., F. H. Linn, J. A. van der Plas, A. Algra and G. J. Rinkel (2007). "Incidence of subarachnoid haemorrhage: a systematic review with emphasis on region, age, gender and time trends." J Neurol Neurosurg Psychiatry 78(12): 1365-1372.

Dhar, R. and M. N. Dinger (2008). "The burden of the systemic inflammatory response predicts vasospasm and outcome after subarachnoid hemorrhage." Neurocrit Care 8(3): 404-412.

Dorhout Mees, S. M., G. J. Rinkel, V. L. Feigin, A. Algra, W. M. van den Bergh, M. Vermeulen and J. van Gijn (2007). "Calcium antagonists for aneurysmal subarachnoid haemorrhage." Cochrane Database Syst Rev(3): CD000277.

Dorsch, N., N. M. Branston, L. Symon and J. Jakubowski (1989). "Intracranial pressure changes following primate subarachnoid haemorrhage." Neurol Res 11(4): 201-204.

Dreier, J. P. (2011). "The role of spreading depression, spreading depolarization and spreading ischemia in neurological disease." Nat Med 17(4): 439-447.

Dreier, J. P., N. Ebert, J. Priller, D. Megow, U. Lindauer, R. Klee, U. Reuter, Y. Imai, K. M. Einhaupl, I. Victorov and U. Dirnagl (2000). "Products of hemolysis in the subarachnoid space inducing spreading ischemia in the cortex and focal necrosis in rats: a model for delayed ischemic neurological deficits after subarachnoid hemorrhage?" J Neurosurg 93(4): 658-666.

Dreier, J. P., S. Major, A. Manning, J. Woitzik, C. Drenckhahn, J. Steinbrink, C. Tolias, A. I. Oliveira-Ferreira, M. Fabricius, J. A. Hartings, P. Vajkoczy, M. Lauritzen, U. Dirnagl, G. Bohner, A. J. Strong and C. s. group (2009). "Cortical spreading ischaemia is a novel process involved in ischaemic damage in patients with aneurysmal subarachnoid haemorrhage." Brain 132(Pt 7): 1866-1881.

Dreier, J. P., J. Woitzik, M. Fabricius, R. Bhatia, S. Major, C. Drenckhahn, T. N. Lehmann, A. Sarrafzadeh, L. Willumsen, J. A. Hartings, O. W. Sakowitz, J. H. Seemann, A. Thieme, M. Lauritzen and A. J. Strong (2006). "Delayed ischaemic neurological deficits after subarachnoid haemorrhage are associated with clusters of spreading depolarizations." Brain 129(Pt 12): 3224-3237.

Dumont, A. S., R. J. Dumont, M. M. Chow, C. L. Lin, T. Calisaneller, K. F. Ley, N. F. Kassell and K. S. Lee (2003). "Cerebral vasospasm after subarachnoid hemorrhage: putative role of inflammation." Neurosurgery 53(1): 123-133; discussion 133-125.

Fabricius, M., N. Akgoren and M. Lauritzen (1995). "Arginine-nitric oxide pathway and cerebrovascular regulation in cortical spreading depression." Am J Physiol 269(1 Pt 2): H23-29.

Faithfull, N. S. (1992). "Oxygen delivery from fluorocarbon emulsions--aspects of convective and diffusive transport." Biomater Artif Cells Immobilization Biotechnol 20(2-4): 797-804.

Feiler, S., B. Friedrich, K. Scholler, S. C. Thal and N. Plesnila (2010). "Standardized induction of subarachnoid hemorrhage in mice by intracranial pressure monitoring." J Neurosci Methods 190(2): 164-170.

Fisher, M. and B. Bastan (2012). "Identifying and utilizing the ischemic penumbra." Neurology 79(13 Suppl 1): S79-85.

Friedrich, B., F. Muller, S. Feiler, K. Scholler and N. Plesnila (2012). "Experimental subarachnoid hemorrhage causes early and long-lasting microarterial constriction and microthrombosis: an in-vivo microscopy study." J Cereb Blood Flow Metab 32(3): 447-455.

Gaetani, P., R. Rodriguez y Baena, S. Quaglini, R. Bellazzi, C. Cafe, C. Torri and F. Marzatico (1994). "Experimental subarachnoid hemorrhage: events related to anti-oxidant enzymatic systems and eicosanoid peroxide enhancement." Neurochem Res 19(7): 839-844.

Geraud, G., M. Tremoulet, A. Guell and A. Bes (1984). "The prognostic value of noninvasive CBF measurement in subarachnoid hemorrhage." Stroke 15(2): 301-305.

Hacke, W., G. Donnan, C. Fieschi, M. Kaste, R. von Kummer, J. P. Broderick, T. Brott, M. Frankel, J. C. Grotta, E. C. Haley, Jr., T. Kwiatkowski, S. R. Levine, C. Lewandowski, M. Lu, P. Lyden, J. R. Marler, S. Patel, B. C. Tilley, G. Albers, E. Bluhmki, M. Wilhelm, S. Hamilton, A. T. Investigators, E. T. Investigators and N. r.-P. S. G. Investigators (2004). "Association of outcome with early stroke treatment: pooled analysis of ATLANTIS, ECASS, and NINDS rt-PA stroke trials." Lancet 363(9411): 768-774.

Hacke, W., A. J. Furlan, Y. Al-Rawi, A. Davalos, J. B. Fiebach, F. Gruber, M. Kaste, L. J. Lipka, S. Pedraza, P. A. Ringleb, H. A. Rowley, D. Schneider, L. H. Schwamm, J. S. Leal, M. Sohngen, P. A. Teal, K. Wilhelm-Ogunbiyi, M. Wintermark and S. Warach (2009). "Intravenous desmoteplase in patients with acute ischaemic stroke selected by MRI perfusion-diffusion weighted imaging or perfusion CT (DIAS-2): a prospective, randomised, double-blind, placebo-controlled study." Lancet Neurol 8(2): 141-150.

Hansen-Schwartz, J. (2004). "Cerebral vasospasm: a consideration of the various cellular mechanisms involved in the pathophysiology." Neurocrit Care 1(2): 235-246.

Hata, R., K. Maeda, D. Hermann, G. Mies and K. A. Hossmann (2000). "Evolution of brain infarction after transient focal cerebral ischemia in mice." J Cereb Blood Flow Metab 20(6): 937-946.

Heiss, W. D. (2000). "Ischemic penumbra: evidence from functional imaging in man." J Cereb Blood Flow Metab 20(9): 1276-1293.

Helbok, R., S. B. Ko, J. M. Schmidt, P. Kurtz, L. Fernandez, H. A. Choi, E. S. Connolly, K. Lee, N. Badjatia, S. A. Mayer and J. Claassen (2011). "Global cerebral edema and brain metabolism after subarachnoid hemorrhage." Stroke 42(6): 1534-1539.

Heuer, G. G., M. J. Smith, J. P. Elliott, H. R. Winn and P. D. LeRoux (2004). "Relationship between intracranial pressure and other clinical variables in patients with aneurysmal subarachnoid hemorrhage." J Neurosurg 101(3): 408-416.

Hijdra, A., J. van Gijn, N. J. Nagelkerke, M. Vermeulen and H. van Crevel (1988). "Prediction of delayed cerebral ischemia, rebleeding, and outcome after aneurysmal subarachnoid hemorrhage." Stroke 19(10): 1250-1256.

Hirashima, Y., S. Nakamura, S. Endo, N. Kuwayama, Y. Naruse and A. Takaku (1997). "Elevation of platelet activating factor, inflammatory cytokines, and coagulation factors in the internal jugular vein of patients with subarachnoid hemorrhage." Neurochem Res 22(10): 1249-1255.

Hop, J. W., G. J. Rinkel, A. Algra and J. van Gijn (1997). "Case-fatality rates and functional outcome after subarachnoid hemorrhage: a systematic review." Stroke 28(3): 660-664.

Hu, S. and L. V. Wang (2010). "Photoacoustic imaging and characterization of the microvasculature." J Biomed Opt 15(1): 011101.

Hu, X. and D. G. Norris (2004). "Advances in high-field magnetic resonance imaging." Annu Rev Biomed Eng 6: 157-184.

Hunt, W. E. and R. M. Hess (1968). "Surgical risk as related to time of intervention in the repair of intracranial aneurysms." J Neurosurg 28(1): 14-20.

Jakobsen, M., J. Overgaard, E. Marcussen and E. M. Enevoldsen (1990). "Relation between angiographic cerebral vasospasm and regional CBF in patients with SAH." Acta Neurol Scand 82(2): 109-115.

Janjua, N. and S. A. Mayer (2003). "Cerebral vasospasm after subarachnoid hemorrhage." Curr Opin Crit Care 9(2): 113-119.

Janssen, B. J., T. De Celle, J. J. Debets, A. E. Brouns, M. F. Callahan and T. L. Smith (2004). "Effects of anesthetics on systemic hemodynamics in mice." Am J Physiol Heart Circ Physiol 287(4): H1618-1624.

Jeon, H., J. Ai, M. Sabri, A. Tariq, X. Shang, G. Chen and R. L. Macdonald (2009). "Neurological and neurobehavioral assessment of experimental subarachnoid hemorrhage." BMC Neurosci 10: 103.

Johnston, S. C., S. Selvin and D. R. Gress (1998). "The burden, trends, and demographics of mortality from subarachnoid hemorrhage." Neurology 50(5): 1413-1418.

Kassell, N. F., T. Sasaki, A. R. Colohan and G. Nazar (1985). "Cerebral vasospasm following aneurysmal subarachnoid hemorrhage." Stroke 16(4): 562-572.

- Kawaguchi, A. T. (2009). "Artificial oxygen carriers: a clinical point of view." Artif Organs 33(2): 97-99.
- Keep, R. F., Y. Hua and G. Xi (2012). "Brain water content. A misunderstood measurement?" Transl Stroke Res 3(2): 263-265.
- Kim, H. W. and A. G. Greenburg (2004). "Artificial oxygen carriers as red blood cell substitutes: a selected review and current status." Artif Organs 28(9): 813-828.
- Kneipp, M., J. Turner, S. Hambauer, S. M. Krieg, J. Lehmborg, U. Lindauer and D. Razansky (2014). "Functional real-time optoacoustic imaging of middle cerebral artery occlusion in mice." PLoS One 9(4): e96118.
- Knuckey, N. W., R. A. Fox, I. Surveyor and B. A. Stokes (1985). "Early cerebral blood flow and computerized tomography in predicting ischemia after cerebral aneurysm rupture." J Neurosurg 62(6): 850-855.
- Kobayashi, H., M. Hayashi, S. Kobayashi, M. Kabuto, Y. Handa, H. Kawano and H. Ide (1991). "Cerebral vasospasm and vasoconstriction caused by endothelin." Neurosurgery 28(5): 673-678; discussion 678-679.
- Komotar, R. J., B. E. Zacharia, R. Valhora, J. Mocco and E. S. Connolly, Jr. (2007). "Advances in vasospasm treatment and prevention." J Neurol Sci 261(1-2): 134-142.
- Kubo, Y., K. Ogasawara, S. Kakino, H. Kashimura, N. Tomitsuka, A. Sugawara and A. Ogawa (2008). "Serum inflammatory adhesion molecules and high-sensitivity C-reactive protein correlates with delayed ischemic neurologic deficits after subarachnoid hemorrhage." Surg Neurol 69(6): 592-596; discussion 596.
- Laufer, J., D. Delpy, C. Elwell and P. Beard (2007). "Quantitative spatially resolved measurement of tissue chromophore concentrations using photoacoustic spectroscopy: application to the measurement of blood oxygenation and haemoglobin concentration." Phys Med Biol 52(1): 141-168.
- Lauritzen, M., J. P. Dreier, M. Fabricius, J. A. Hartings, R. Graf and A. J. Strong (2011). "Clinical relevance of cortical spreading depression in neurological disorders: migraine, malignant stroke, subarachnoid and intracranial hemorrhage, and traumatic brain injury." J Cereb Blood Flow Metab 31(1): 17-35.

Lees, K. R., E. Bluhmki, R. von Kummer, T. G. Brott, D. Toni, J. C. Grotta, G. W. Albers, M. Kaste, J. R. Marler, S. A. Hamilton, B. C. Tilley, S. M. Davis, G. A. Donnan, W. Hacke, A. N. Ecass, E. r.-P. S. Group, K. Allen, J. Mau, D. Meier, G. del Zoppo, D. A. De Silva, K. S. Butcher, M. W. Parsons, P. A. Barber, C. Levi, C. Bladin and G. Byrnes (2010). "Time to treatment with intravenous alteplase and outcome in stroke: an updated pooled analysis of ECASS, ATLANTIS, NINDS, and EPITHET trials." Lancet 375(9727): 1695-1703.

Li, C., A. Aguirre, J. Gamelin, A. Maurudis, Q. Zhu and L. V. Wang (2010). "Real-time photoacoustic tomography of cortical hemodynamics in small animals." J Biomed Opt 15(1): 010509.

Li, M. H., Y. S. Cheng, Y. D. Li, C. Fang, S. W. Chen, W. Wang, D. J. Hu and H. W. Xu (2009). "Large-cohort comparison between three-dimensional time-of-flight magnetic resonance and rotational digital subtraction angiographies in intracranial aneurysm detection." Stroke 40(9): 3127-3129.

Liu, F. and L. D. McCullough (2011). "Middle cerebral artery occlusion model in rodents: methods and potential pitfalls." J Biomed Biotechnol 2011: 464701.

Losiniecki, A. and M. Zuccarello (2008). "Subarachnoid hemorrhage: effect on cerebral blood flow and cerebral metabolism." Front Biosci 13: 1845-1856.

Macdonald, R. L., N. F. Kassell, S. Mayer, D. Ruefenacht, P. Schmiedek, S. Weidauer, A. Frey, S. Roux, A. Pasqualin and C.-. Investigators (2008). "Clazosentan to overcome neurological ischemia and infarction occurring after subarachnoid hemorrhage (CONSCIOUS-1): randomized, double-blind, placebo-controlled phase 2 dose-finding trial." Stroke 39(11): 3015-3021.

Macdonald, R. L., R. M. Pluta and J. H. Zhang (2007). "Cerebral vasospasm after subarachnoid hemorrhage: the emerging revolution." Nat Clin Pract Neurol 3(5): 256-263.

Megyesi, J. F., B. Vollrath, D. A. Cook and J. M. Findlay (2000). "In vivo animal models of cerebral vasospasm: a review." Neurosurgery 46(2): 448-460; discussion 460-441.

Molyneux, A. J., R. S. Kerr, L. M. Yu, M. Clarke, M. Sneade, J. A. Yarnold, P. Sandercock and G. International Subarachnoid Aneurysm Trial Collaborative (2005). "International subarachnoid aneurysm trial (ISAT) of neurosurgical clipping versus endovascular coiling in 2143 patients with ruptured intracranial aneurysms: a randomised comparison of effects on survival, dependency, seizures, rebleeding, subgroups, and aneurysm occlusion." Lancet 366(9488): 809-817.

Mun-Bryce, S. and G. A. Rosenberg (1998). "Matrix metalloproteinases in cerebrovascular disease." J Cereb Blood Flow Metab 18(11): 1163-1172.

Neil-Dwyer, G., D. A. Lang, B. Doshi, C. J. Gerber and P. W. Smith (1994). "Delayed cerebral ischaemia: the pathological substrate." Acta Neurochir (Wien) 131(1-2): 137-145.

Nishziawa, S. (2011). "Roles of signal transduction mechanisms in cerebral vasospasm following subarachnoid hemorrhage: overview." Acta Neurochir Suppl 110(Pt 1): 27-30.

Ntziachristos, V., C. Bremer and R. Weissleder (2003). "Fluorescence imaging with near-infrared light: new technological advances that enable in vivo molecular imaging." Eur Radiol 13(1): 195-208.

Ntziachristos, V. and D. Razansky (2010). "Molecular imaging by means of multispectral optoacoustic tomography (MSOT)." Chem Rev 110(5): 2783-2794.

Pierpaoli, C., J. R. Alger, A. Righini, J. Mattiello, R. Dickerson, D. Des Pres, A. Barnett and G. Di Chiro (1996). "High temporal resolution diffusion MRI of global cerebral ischemia and reperfusion." J Cereb Blood Flow Metab 16(5): 892-905.

Pluta, R. M., B. G. Thompson, J. K. Afshar, R. J. Boock, B. Iuliano and E. H. Oldfield (2001). "Nitric oxide and vasospasm." Acta Neurochir Suppl 77: 67-72.

Prass, K. and U. Dirnagl (1998). "Glutamate antagonists in therapy of stroke." Restor Neurol Neurosci 13(1-2): 3-10.

Prunell, G. F., N. A. Svendgaard, K. Alkass and T. Mathiesen (2005). "Inflammation in the brain after experimental subarachnoid hemorrhage." Neurosurgery 56(5): 1082-1092; discussion 1082-1092.

Rabinstein, A. A., J. A. Friedman, S. D. Weigand, R. L. McClelland, J. R. Fulgham, E. M. Manno, J. L. Atkinson and E. F. Wijdicks (2004). "Predictors of cerebral infarction in aneurysmal subarachnoid hemorrhage." Stroke 35(8): 1862-1866.

Rapp, J. H., X. M. Pan, B. Yu, R. A. Swanson, R. T. Higashida, P. Simpson and D. Saloner (2003). "Cerebral ischemia and infarction from atheroemboli <100 microm in Size." Stroke 34(8): 1976-1980.

Rasmussen, G., J. Hauerberg, G. Waldemar, F. Gjerris and M. Juhler (1992). "Cerebral blood flow autoregulation in experimental subarachnoid haemorrhage in rat." Acta Neurochir (Wien) 119(1-4): 128-133.

Ratsep, T. and T. Asser (2001). "Cerebral hemodynamic impairment after aneurysmal subarachnoid hemorrhage as evaluated using transcranial doppler ultrasonography: relationship to delayed cerebral ischemia and clinical outcome." J Neurosurg 95(3): 393-401.

Riess, J. G. (2005). "Understanding the fundamentals of perfluorocarbons and perfluorocarbon emulsions relevant to in vivo oxygen delivery." Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol 33(1): 47-63.

Ritman, E. L. (2011). "Current status of developments and applications of micro-CT." Annu Rev Biomed Eng 13: 531-552.

Romano, J. G., A. A. Rabinstein, K. L. Arheart, S. Nathan, I. Campo-Bustillo, S. Koch and A. M. Forteza (2008). "Microemboli in aneurysmal subarachnoid hemorrhage." J Neuroimaging 18(4): 396-401.

Roos, Y. B., R. J. de Haan, L. F. Beenen, R. J. Groen, K. W. Albrecht and M. Vermeulen (2000). "Complications and outcome in patients with aneurysmal subarachnoid haemorrhage: a prospective hospital based cohort study in the Netherlands." J Neurol Neurosurg Psychiatry 68(3): 337-341.

Rowe, J. G., N. Soper, R. Ouwerkerk, R. S. Kerr, G. K. Radda and B. Rajagopalan (1995). "Delayed ischaemia after subarachnoid haemorrhage: a role for small vessel changes." J Neurol Neurosurg Psychiatry 59(4): 451-452.

Sarrafzadeh, A. S., D. Haux, L. Ludemann, H. Amthauer, M. Plotkin, I. Kuchler and A. W. Unterberg (2004). "Cerebral ischemia in aneurysmal subarachnoid hemorrhage: a correlative microdialysis-PET study." Stroke 35(3): 638-643.

Schmieder, K., F. Moller, M. Engelhardt, M. Scholz, W. Schregel, A. Christmann and A. Harders (2006). "Dynamic cerebral autoregulation in patients with ruptured and unruptured aneurysms after induction of general anesthesia." Zentralbl Neurochir 67(2): 81-87.

Schubert, G. A., S. Poli, L. Schilling, S. Heiland and C. Thome (2008). "Hypothermia reduces cytotoxic edema and metabolic alterations during the acute phase of massive SAH: a diffusion-weighted imaging and spectroscopy study in rats." J Neurotrauma 25(7): 841-852.

Schubert, G. A., M. Seiz, A. A. Hegewald, J. Manville and C. Thome (2009). "Acute hypoperfusion immediately after subarachnoid hemorrhage: a xenon contrast-enhanced CT study." J Neurotrauma 26(12): 2225-2231.

Schubert, G. A. and C. Thome (2008). "Cerebral blood flow changes in acute subarachnoid hemorrhage." Front Biosci 13: 1594-1603.

Schutt, E. G., D. H. Klein, R. M. Mattrey and J. G. Riess (2003). "Injectable microbubbles as contrast agents for diagnostic ultrasound imaging: the key role of perfluorochemicals." Angew Chem Int Ed Engl 42(28): 3218-3235.

Schwartz, A. Y., A. Masago, F. A. Sehba and J. B. Bederson (2000). "Experimental models of subarachnoid hemorrhage in the rat: a refinement of the endovascular filament model." J Neurosci Methods 96(2): 161-167.

Sehba, F. A. and J. B. Bederson (2006). "Mechanisms of acute brain injury after subarachnoid hemorrhage." Neurol Res 28(4): 381-398.

Sehba, F. A. and V. Friedrich (2013). "Cerebral microvasculature is an early target of subarachnoid hemorrhage." Acta Neurochir Suppl 115: 199-205.

Sehba, F. A., J. Hou, R. M. Pluta and J. H. Zhang (2012). "The importance of early brain injury after subarachnoid hemorrhage." Prog Neurobiol 97(1): 14-37.

Sehba, F. A., G. Mostafa, V. Friedrich, Jr. and J. B. Bederson (2005). "Acute microvascular platelet aggregation after subarachnoid hemorrhage." J Neurosurg 102(6): 1094-1100.

Sehba, F. A., A. Y. Schwartz, I. Chereshev and J. B. Bederson (2000). "Acute decrease in cerebral nitric oxide levels after subarachnoid hemorrhage." J Cereb Blood Flow Metab 20(3): 604-611.

Sevick, R. J., J. Kucharczyk, J. Mintorovitch, M. E. Moseley, N. Derugin and D. Norman (1990). "Diffusion-weighted MR imaging and T2-weighted MR imaging in acute cerebral ischaemia: comparison and correlation with histopathology." Acta Neurochir Suppl (Wien) 51: 210-212.

Spiess, B. D. (2009). "Perfluorocarbon emulsions as a promising technology: a review of tissue and vascular gas dynamics." J Appl Physiol 106(4): 1444-1452.

Stein, S. C., J. M. Levine, S. Nagpal and P. D. LeRoux (2006). "Vasospasm as the sole cause of cerebral ischemia: how strong is the evidence?" Neurosurg Focus 21(3): E2.

Stevens, R. D. and P. A. Nyquist (2007). "The systemic implications of aneurysmal subarachnoid hemorrhage." J Neurol Sci 261(1-2): 143-156.

Teasdale, G. M., C. G. Drake, W. Hunt, N. Kassell, K. Sano, B. Pertuiset and J. C. De Villiers (1988). "A universal subarachnoid hemorrhage scale: report of a committee of the World Federation of Neurosurgical Societies." J Neurol Neurosurg Psychiatry 51(11): 1457.

Thal, S. C., S. Sporer, M. Klopotoski, S. E. Thal, J. Woitzik, R. Schmid-Elsaesser, N. Plesnila and S. Zausinger (2009). "Brain edema formation and neurological impairment after subarachnoid hemorrhage in rats. Laboratory investigation." J Neurosurg 111(5): 988-994.

Theilen, H., H. Schrock and W. Kuschinsky (1994). "Gross persistence of capillary plasma perfusion after middle cerebral artery occlusion in the rat brain." J Cereb Blood Flow Metab 14(6): 1055-1061.

Tiebosch, I. A., W. M. van den Bergh, M. J. Bouts, R. Zwartbol, A. van der Toorn and R. M. Dijkhuizen (2013). "Progression of brain lesions in relation to hyperperfusion from subacute to chronic stages after experimental subarachnoid hemorrhage: a multiparametric MRI study." Cerebrovasc Dis 36(3): 167-172.

Titova, E., R. P. Ostrowski, J. H. Zhang and J. Tang (2009). "Experimental models of subarachnoid hemorrhage for studies of cerebral vasospasm." Neurol Res 31(6): 568-581.

Uhl, E., J. Lehmborg, H. J. Steiger and K. Messmer (2003). "Intraoperative detection of early microvasospasm in patients with subarachnoid hemorrhage by using orthogonal polarization spectral imaging." Neurosurgery 52(6): 1307-1315; discussion 1315-1307.

van den Bergh, W. M., J. Schepers, W. B. Veldhuis, K. Nicolay, C. A. Tulleken and G. J. Rinkel (2005). "Magnetic resonance imaging in experimental subarachnoid haemorrhage." Acta Neurochir (Wien) 147(9): 977-983; discussion 983.

van der Wee, N., G. J. Rinkel, D. Hasan and J. van Gijn (1995). "Detection of subarachnoid haemorrhage on early CT: is lumbar puncture still needed after a negative scan?" J Neurol Neurosurg Psychiatry 58(3): 357-359.

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

Vergouwen, M. D., N. Etminan, D. Ilodigwe and R. L. Macdonald (2011). "Lower incidence of cerebral infarction correlates with improved functional outcome after aneurysmal subarachnoid hemorrhage." J Cereb Blood Flow Metab 31(7): 1545-1553.

Vergouwen, M. D., D. Ilodigwe and R. L. Macdonald (2011). "Cerebral infarction after subarachnoid hemorrhage contributes to poor outcome by vasospasm-dependent and -independent effects." Stroke 42(4): 924-929.

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

Vergouwen, M. D., M. Vermeulen, R. J. de Haan, M. Levi and Y. B. Roos (2007). "Dihydropyridine calcium antagonists increase fibrinolytic activity: a systematic review." J Cereb Blood Flow Metab 27(7): 1293-1308.

Voldby, B. (1988). "Pathophysiology of subarachnoid haemorrhage. Experimental and clinical data." Acta Neurochir Suppl (Wien) 45: 1-6.

Wang, L. V. (2009). "Multiscale photoacoustic microscopy and computed tomography." Nat Photonics 3(9): 503-509.

Wang, X., Y. Pang, G. Ku, X. Xie, G. Stoica and L. V. Wang (2003). "Noninvasive laser-induced photoacoustic tomography for structural and functional in vivo imaging of the brain." Nat Biotechnol 21(7): 803-806.

Warach, S., D. Chien, W. Li, M. Ronthal and R. R. Edelman (1992). "Fast magnetic resonance diffusion-weighted imaging of acute human stroke." Neurology 42(9): 1717-1723.

Wardlaw, J. M. (2010). "Neuroimaging in acute ischaemic stroke: insights into unanswered questions of pathophysiology." J Intern Med 267(2): 172-190.

Winslow, R. M. (2006). "Current status of oxygen carriers ('blood substitutes'): 2006." Vox Sang 91(2): 102-110.

Wintermark, M., A. E. Flanders, B. Velthuis, R. Meuli, M. van Leeuwen, D. Goldsher, C. Pineda, J. Serena, I. van der Schaaf, A. Waaijer, J. Anderson, G. Nesbit, I. Gabriely, V. Medina, A. Quiles, S. Pohlman, M. Quist, P. Schnyder, J. Bogousslavsky, W. P. Dillon and S. Pedraza (2006). "Perfusion-CT assessment of infarct core and penumbra: receiver operating characteristic curve analysis in 130 patients suspected of acute hemispheric stroke." Stroke 37(4): 979-985.

Wintermark, M., R. Meuli, P. Browaeys, M. Reichhart, J. Bogousslavsky, P. Schnyder and P. Michel (2007). "Comparison of CT perfusion and angiography and MRI in selecting stroke patients for acute treatment." Neurology 68(9): 694-697.

Woitzik, J., N. Weinzierl and L. Schilling (2005). "Early administration of a second-generation perfluorochemical decreases ischemic brain damage in a model of permanent middle cerebral artery occlusion in the rat." Neurol Res 27(5): 509-515.

Yang, Z. J., C. D. Price, G. Bosco, M. Tucci, N. S. El-Badri, D. Mangar and E. M. Camporesi (2008). "The effect of isovolemic hemodilution with oxybyte, a perfluorocarbon emulsion, on cerebral blood flow in rats." PLoS One 3(4): e2010.

Yao, J., J. Xia, K. I. Maslov, M. Nasiriavanaki, V. Tsytsarev, A. V. Demchenko and L. V. Wang (2013). "Noninvasive photoacoustic computed tomography of mouse brain metabolism in vivo." Neuroimage 64: 257-266.

Zhu, X. H., J. M. Chen, T. W. Tu, W. Chen and S. K. Song (2013). "Simultaneous and noninvasive imaging of cerebral oxygen metabolic rate, blood flow and oxygen extraction fraction in stroke mice." Neuroimage 64: 437-447.

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Absorptionsspektrum des Hämoglobins .....	19
Abbildung 2: Intubationstubus.....	26
Abbildung 3: Schematische Darstellung des MCAO-Modells.....	27
Abbildung 4: Schematische Darstellung des endoluminalen Perforationsmodells der SAB.....	28
Abbildung 5: Schematischer Aufbau des MSOT .....	30
Abbildung 6: Ablauf der Messungen im MCAO-Modell .....	31
Abbildung 7: Ablauf der Messungen im endoluminalen Perforationsmodell der SAB .....	32
Abbildung 8: Schematische Darstellung der "filtered backprojection"-Technik.....	33
Abbildung 9: Perfluoro-t-butylcyclohexan-Strukturformel .....	35
Abbildung 10: MCAO-Vergleich: MSOT-Schnittbild Maus 6, Slide 12 und Histologie.....	40
Abbildung 11: MCAO-Vergleich: MSOT-Schnittbilder mit Histologie in den Tieren 3, 4 und 5 .....	40
Abbildung 12: MCAO-Vergleich: MSOT nativ mit MSOT nach ICG-Gabe (Maus 6, Slide 12) .....	41
Abbildung 13: Hämoglobin-Spektroskopie (Maus 6, Slide 12).....	41
Abbildung 14: Vergleichende prä-/postoperative Tomographie Maus 7 .....	42
Abbildung 15: MCAO-Vergleich: Zeitlicher Verlauf der DeOxy-Hämoglobinspektroskopie dreier Tiere .....	43
Abbildung 16: MCAO-Vergleich: Blutvolumenverhältnisse aller Tiere im Verlauf.....	44
Abbildung 17: SAB-Vergleich: MSOT-Schnittbild Maus 10, Slide 10 mit Histologie.....	46
Abbildung 18: SAB-Vergleich: MSOT nativ mit MSOT nach ICG-Gabe (Maus 10, Slide 10) .....	46
Abbildung 19: SAB-Vergleich: Spektroskopie 24 h nach Blutung mit Histologie .....	47
Abbildung 20: SAB-Vergleich: Prä-/postoperative MSOT-Bilder der zweiten Versuchsreihe .....	48
Abbildung 21: Oxycyte <sup>®</sup> -Pilotstudie: Vergleich der Mortalitätsraten.....	49
Abbildung 22: Oxycyte <sup>®</sup> -Pilotstudie: Vergleich des Hirnwassergehalts.....	50
Abbildung 23: Oxycyte <sup>®</sup> -Pilotstudie: Vergleich der Schweregrade in der neurologischen Testung.....	51

## Danksagung

Da man eine solche Arbeit unmöglich alleine bewerkstelligen kann gilt mein Dank, all denen, die zum guten Gelingen beitragen haben.

In erster Linie Prof. Dr. Ute Lindauer, die mich über alle Hürden hinweg unterstützt hat. Sie hat mir gezeigt worauf es beim wissenschaftlichen Arbeiten ankommt, Ergebnisse kritisch zu hinterfragen und bei allen Rückschlägen den Mut nicht zu verlieren. Vielen Dank!

Dann gebührt mein Dank Prof. Dr. Jens Lehmborg, der mir - nach der Überlassung des ursprünglichen Themas - ermöglicht hat, von diesem aufgrund äußerer Umstände doch erheblich abzuweichen und alle meine Entscheidungen mitgetragen hat.

Vielen Dank auch an PD Dr. Sandro Krieg, der sich - neben der tatkräftigen Starthilfe in der schwierigen Anfangsphase – in seiner raren Freizeit stets um den Fortgang der Dissertation bemüht hat.

Ohne die tatkräftige Unterstützung des technischen Personals am Lehrstuhl für Experimentelle Neurochirurgie wäre diese Arbeit nicht entstanden. Daher persönlichen Dank an Martina Schreiber, Irina Eskina und Svetlana Lachmann, dass sie mir geduldig beigestanden sind.

Ein weiterer persönlicher Dank gebührt Dr. Benjamin Friedrich, der mich in die Geheimnisse des endoluminalen Perforationsmodells der SAB einweihte.

Ein herzliches Dankeschön natürlich auch meinen Mitdoktoranden, die für ein sehr kollegiales Arbeitsklima im Labor gesorgt haben und für manchen wissenschaftlichen Anstoß.

Vielen Dank auch an Oxygen Biotherapeutics Inc. und deren Nachfolger Tenax Inc., die uns Oxycyte<sup>®</sup> in einem „Material Transfer Agreement“ zur Verfügung gestellt haben, sowie die Daten zur Veröffentlichung im Rahmen dieser Arbeit.

Die Kollegen vom IBMI am Helmholtz-Zentrum, namentlich Moritz Kneipp, Jake Turner und Daniel Razansky, dürfen hier nicht vergessen werden, da ohne sie sowohl die Bildakquise als auch die nachfolgende Bildverarbeitung nicht möglich gewesen wäre. Sie waren für jeden unserer Vorschläge

offen und sehr bemüht unseren Ideen nachzukommen. Ich wünsche Moritz und Jake alles Gute für ihre eigene Promotion!

Und zu guter Letzt natürlich meiner Familie, die mich an jedem Tiefpunkt aufgefangen haben und mich motiviert haben weiterzumachen, aber auch die Erfolge mit mir geteilt haben. Vor allem ihnen verdanke ich es diese Arbeit nun in Händen zu halten! Vielen Dank, dass ihr mich bei allem, was ich tue, unterstützt und an mich glaubt!